

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1976 - N° 118

**INFLUENCE D'EXCIPIENTS GALENIQUES
SUR LA BIODISPONIBILITE
DES ANTIGENES T.A.B.D.T.
ADMINISTRÉS PAR VOIE RECTALE
CHEZ LE LAPIN**

THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 6 Janvier 1976
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

JRAD Majid

né le 13 Octobre 1942

à EZAOUIA, JERBA (Tunisie)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1976 - N° 118

**INFLUENCE D'EXCIPIENTS GALENIQUES
SUR LA BIODISPONIBILITE
DES ANTIGENES T.A.B.D.T.
ADMINISTRES PAR VOIE RECTALE
CHEZ LE LAPIN**

THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 6 Janvier 1976
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

JRAD Majid

né le 13 Octobre 1942

à EZAOUIA, JERBA (Tunisie)

UNIVERSITY OF LEIDEN
LIBRARY OF THE
FACULTY OF MEDICINE

1871

THEORY OF THE
EARTH AND
ATMOSPHERE
AND THE
OCEAN



1871

THEORY OF THE
EARTH AND
ATMOSPHERE
AND THE
OCEAN

1871

THEORY OF THE
EARTH AND
ATMOSPHERE
AND THE
OCEAN

UNIVERSITE CLAUDE - BERNARD - LYON 1

Président : Mr. le Pr. J. BOIDIN

Premier Vice-Président : Mr. le Pr. R. TOURAINE

Deuxième Vice-Président : Mr. P. PONCET, Maître-assistant

Troisième Vice-Président : Mr. C. BADOR, étudiant

Secrétaire Général de l'Université : Mr. J. RAMBAUD, administrateur civil.

Unités d'Enseignement et de Recherche (U.E.R.)

U.E.R. médicale GRANGE-BLANCHE : Mr. le Pr. D. GERMAIN

U.E.R. médicale ALEXIS-CARREL : Mr. le Pr. C. GIROD

U.E.R. médicale LYON-NORD : Mr. le Pr. J.P. GARIN

U.E.R. médicale SUD-OUEST : Mr. le Pr. J. ROBERT

U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques : Mr. le Pr. L. ODDOUX

U.E.R. des Techniques de Réadaptation : Mr. A. MORGON, Maître de Conférences

U.E.R. de Biologie Humaine : Mr. le Pr. J.C. CZYBA

U.E.R. d'Education Physique et Sportive : Mr. A. MILLON, Professeurs d'E.P.S.

U.E.R. des Sciences Odontologiques : Mr. le Dr. R. VINCENT

U.E.R. de Mathématiques : Mr. le Pr. G. MAURY

U.E.R. de Physique : Mr. le Pr. R. UZAN

U.E.R. de Chimie et Biochimie : Mr. le Pr. J. HUET

U.E.R. des Sciences de la Nature : Mr. le Pr. J. BRUN

U.E.R. de Sciences Physiologiques : Mr. R. FONTANGES, Maître de Conférences

U.E.R. de Physique nucléaire : Mr. le Pr. A. SARAZIN

U.E.R. de Mécanique : Mr. le Pr. J. MATHIEU

Observatoire de LYON : Mr. le Pr. J.H. BIGAY

I.U.T. 1 : Mr. le Pr. POUYET

I.U.T. 2 : Mr. J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

Le présent travail s'inscrit dans le cadre
d'une étroite coopération scientifique entre :

LE SERVICE D'IMMUNOLOGIE
DE L'INSTITUT PASTEUR DE LYON,

LE DEPARTEMENT DE GALENIQUE
DE L'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES DE LYON

et L'INSTITUT DE RECHERCHE SCIENTIFIQUE
DES LABORATOIRES SARBACH
A CHATILLON-SUR-CHALARONNE..

A MA FEMME :

A tout le bonheur qu'elle nous a donné,
à son courage, à sa volonté. Elle fut
le soutien moral indispensable à la
réalisation de ce travail.

A MES ENFANTS :

Leïla, Nadia ...

A MES PARENTS :

Je ne saurais en quelques mots leur exprimer
toute mon affection, leur patience et leurs
sacrifices pour leurs enfants sont sans
limites, qu'ils trouvent dans ce travail
l'expression de mon affection.

A MES BEAUX-PARENTS :

Pour leur dévouement et leur soutien,
je leur exprime ici toute mon affection.

A MES SOEURS ET FRERES :

Pour les liens qui nous unissent.

A MES BELLES-SOEURS ET BEAUX-FRERES.

A MES NEVEUX.

A TOUTE MA FAMILLE.

A MES AMIS.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. ROLLET

Il nous a fait le grand honneur
d'accepter la présidence de notre
Jury de thèse.

Durant nos études, il nous a accueilli
dans son laboratoire et nous a initié
à la recherche galénique avec beaucoup
de patience et de sollicitude. La
qualité de son enseignement et les
conseils qu'il nous a prodigués ont
permis notre orientation.

Sa grande bienveillance à notre égard
contribua largement à développer en
nous le goût de l'enseignement et de
la recherche.

Qu'il veuille trouver ici l'expression
de notre profonde gratitude.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY :

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. REVOL :

Nous avons toujours trouvé auprès de lui un accueil chaleureux ; nous garderons un excellent souvenir de son enseignement, de sa puissance de travail et de sa vivacité d'esprit.

Il a aimablement accepté de siéger dans ce Jury. Nous le prions de croire à l'expression de notre profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR L. ODDOUX :

Nous le remercions de l'attention qu'il nous a portée en acceptant de faire partie du Jury de notre thèse. Nous avons été toujours séduit par son dynamisme, son intelligence et sa valeur scientifique.

Nous le prions de trouver ici le témoignage de notre profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR M. CARRAZ :

Il est l'instigateur du sujet de thèse pour lequel il nous a toujours guidé et encouragé. Il nous a accueilli à l'Institut Pasteur et nous a procuré les moyens nécessaires pour réaliser ce travail.

Nous avons bénéficié de sa haute expérience dans le domaine de la recherche en Immunologie.

Nous le remercions vivement de sa bienveillance, de sa sympathie à notre égard, et le prions d'accepter l'expression de notre respectueux attachement.

A MONSIEUR J. JACQ :

Pharmacien-Chimiste du Service de Santé des Armées,

Statisticien d'une grande compétence, il a bien voulu contribuer à l'élaboration de ce travail en nous guidant dans l'interprétation statistique des résultats.

Qu'il trouve ici l'expression de nos remerciements.

A MADAME VEYSSEYRE :

Nous ne saurions assez lui exprimer notre reconnaissance, pour avoir toujours trouvé en elle une conseillère attentive dont la bonté nous a touché.

Malgré les responsabilités qu'elle assume, elle a bien voulu nous accorder le sacrifice de son temps...

Grâce à elle, notre travail s'est enrichi de tout ce qu'elle a bien voulu lui apporter de ses connaissances et de sa rigueur scientifique.

Qu'elle veuille bien trouver ici le témoignage de notre admiration et de notre respect.

A MADAME BRUNET :

Chef de Service de Galénique des Laboratoires Sarbach,

Elle nous a reçu avec bienveillance au cours de notre stage aux Laboratoires Sarbach.

Sa grande expérience en Pharmacie galénique doublée d'un esprit critique ont été pour nous déterminants dans la conduite de ce travail.

Qu'elle trouve ici l'expression de nos remerciements.

A MADEMOISELLE ROBELIN :

Maître-Assistant au Laboratoire de Galénique de la Faculté de Lyon,

Elle s'est toujours montrée très attentive à l'évolution de nos travaux. Nous avons apprécié sa gentillesse et sa disponibilité à notre égard.

La réalisation de cette thèse s'est toujours déroulée dans un climat de parfaite collaboration et de profonde estime entre les différents services.

Nous tenons à remercier les membres du personnel technique et administratif du Département d'Immunologie de l'Institut Pasteur, dont certains ont fait preuve d'une grande amabilité, en particulier : MADEMOISELLE SCHWARTZ et MADAME GUY, pour l'aide qu'elles nous ont apportée en assurant avec rapidité et efficacité tout le travail de secrétariat.

Nous tenons aussi à remercier tous les membres du Département de Galénique de l'Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques de Lyon.

Nos remerciements vont aussi à tout le personnel technique et administratif des Laboratoires SARBACH : leur accueil a été pour nous sympathique et courtois. Nous remercions en particulier MONSIEUR DARGAUD et toute l'équipe du Laboratoire de Galénique, pour leur collaboration efficace.

Nous remercions aussi Madame DAVID M., Technicienne de Laboratoire au C.R.E.S.S.A. de Lyon, pour sa contribution à la préparation et à la conduite des traitements informatiques.

Nous ne saurions oublier nos camarades de promotion de l'Institut de Pharmacie Industrielle de Lyon, ainsi que ceux de l'Institut Pasteur de Lyon, pour le climat international d'amitié et d'échange intellectuel permanent qu'ils ont su créer. Nous leur exprimons ici toute notre amitié.

I N T R O D U C T I O N

L'absorption des substances médicamenteuses par voie rectale est bien établie, et cette voie d'administration peut apparaître comme fiable. Mais la forme galénique sous laquelle le principe actif est administré a une influence certaine sur son action biologique. En effet, elle ne définit pas seulement la forme apparente, mais aussi l'organisation interne du médicament (relation : excipient/principe actif) ; elle conditionne donc l'efficacité du principe actif au niveau de l'organisme.

Cette biodisponibilité des préparations médicamenteuses par voie rectale a déjà fait l'objet de nombreux travaux (18, 66) : ils ont mis en évidence les différents facteurs pouvant influencer le processus de libération du principe actif et sa résorption, en particulier dans la forme suppositoire. Certains de ces facteurs sont communs aux autres voies d'administration, mais d'autres sont spécifiques de l'administration rectale ; parmi eux, nous pouvons citer :

- les conditions physiologiques de l'absorption rectale ;
- les facteurs liés à la nature propre du principe actif ;
- les facteurs liés à la formulation, et en particulier à l'excipient, etc...

Le but de notre travail est d'étudier l'influence des excipients sur l'absorption rectale de différents antigènes : antigènes diphtériques, tétaniques, typhiques et paratyphiques A et B chez le lapin. En effet, certains auteurs ont montré que la question de l'absorption d'un principe actif appliqué par voie rectale ne peut être résolue qu'in vivo - KUNZE (55). Nous avons choisi le lapin, animal supportant assez bien la situation d'instrument d'expérience et répondant parfaitement aux sollicitations des antigènes les plus variés.

Le plan de notre travail se divise en cinq parties :

- En premier lieu, un rappel sur le système lymphoïde du lapin nous a paru important pour le cadre de notre travail.
- La deuxième partie est consacrée à l'étude des composants de la forme galénique utilisée (principes actifs et excipients).
- Dans la troisième partie, nous avons rassemblé les modalités expérimentales que nous avons pratiquées, c'est-à-dire la fabrication de suppositoires, le protocole de l'immunisation et le contrôle de cette immunisation.
- La quatrième partie expose au moyen de tableaux et de courbes les résultats de cette expérimentation.
- La cinquième partie concerne l'analyse et la discussion de ces résultats.

P L A N

INTRODUCTION.

Première partie :

RAPPEL SUR LE SYSTEME LYMPHOIDE DU LAPIN.

1. SCHEMA GENERAL DU SYSTEME DIGESTIF.
2. DESCRIPTION DU SYSTEME LYMPHOIDE DU LAPIN.
 - 2.1. Description générale.
 - 2.2. Les immunocytes.
 - 2.3. Les follicules ou nodules lymphatiques.
 - 2.4. Les plaques de Peyer.
 - 2.5. L'appendice.
3. ROLE DU SYSTEME LYMPHOIDE INTESTINAL DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'IMMUNITE.
 - 3.1. Le mécanisme de synthèse des anticorps.
 - 3.2. Lieu de synthèse des anticorps.
 - 3.3. Rôle de la coopération cellulaire dans la synthèse des anticorps.
 - 3.4. Les immunoglobulines du lapin.
 - 3.5. Résumé.

Deuxième partie :

LES COMPOSANTS DE LA FORME GALENIQUE.

1. LES ANTIGENES UTILISES.

1.1. Généralités sur les antigènes.

1.1.1. Définition

1.1.2. Propriétés générales des antigènes.

1.1.3. La spécificité antigénique.

1.2. Nature et caractéristique des antigènes utilisés.

1.2.1. Les antigènes constitutifs.

1.2.1.1. Les antigènes somatiques.

1.2.1.2. Les antigènes flagellaires H.

1.2.2. Les anatoxines diphtérique et tétanique.

1.2.2.1. La toxine diphtérique.

1.2.2.2. La toxine tétanique.

1.2.2.3. Le mécanisme de la détoxification des toxines diphtérique et tétanique.

2. LES EXCIPIENTS UTILISES.

2.1. Définition.

2.2. Les bases ou véhicules.

2.2.1. Fabrication.

2.2.2. Caractères des différentes variétés.

2.2.3. Les adjuvants de l'immunité.

2.3.1. Définition.

2.3.2. Les principales substances adjuvantes.

2.3.2.1. Les adjuvants huileux.

2.3.2.2. Les adjuvants aqueux.

2.3.2.3. Les adjuvants extraits de microorganismes ou de plantes.

2.3.3. Hypothèse sur le mécanisme d'action des adjuvants de l'immunité.

2.3.4. Nature et structure de l'adjuvant utilisé.

Troisième partie :

LES MODALITES EXPERIMENTALES.

1. LA FABRICATION DES SUPPOSITOIRES.

1.2. La fabrication des suppositoires proprement dite.

1.2.1. La formulation.

1.2.2. Préparation des substances.

1.2.2.1. Traitement du D.T.T.A.B. lyophilisé.

1.2.2.2. Traitement de l'adjuvant Principe Actif Ducton.

- 1.2.3. Préparation de la masse.
 - 1.2.3.1. Incorporation du D.T.T.A.B.
 - 1.2.3.2. Incorporation du Principe Actif Ducton.
 - 1.2.3.3. Division de la masse.

2. LE PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'IMMUNISATION.

- 2.1. Chronologie des essais d'immunisation.
- 2.2. Les modalités d'application du suppositoire.
- 2.3. Les modalités des prélèvements de sang.

3. LES METHODES DE CONTROLE DE L'IMMUNISATION.

- 3.1. Titrage des anticorps antidiphtériques par hémagglutination passive.
 - 3.1.1. Principe.
 - 3.1.2. Réactifs.
 - 3.1.2.1. Solutions tampons.
 - 3.1.2.2. Le sérum normal de lapin.
 - 3.1.2.3. Solution d'acide tannique.
 - 3.1.2.4. Sensibilisation des hématies de cheval.
 - 3.1.3. Réaction.
 - 3.1.3.1. Dilution des sérums.
 - 3.1.3.2. La réaction proprement dite.
 - 3.1.3.3. Lecture de la réaction.
 - 3.1.3.4. Calcul du titre.
- 3.2. Titrage des anticorps antitétaniques.
 - 3.2.1. Principe de la réaction.
 - 3.2.2. Technique du test.
 - 3.2.2.1. Antigène utilisé.
 - 3.2.2.2. Sensibilisation du latex.
 - 3.2.2.3. Test au latex.
 - 3.2.2.4. Lecture de la réaction.
- 3.3. Titrage des anticorps anti-Salmonella typhiques et paratyphiques A et B.
 - 3.3.1. Principe
 - 3.3.2. Technique.
 - 3.3.3. Lecture.

Quatrième partie :

LES RESULTATS EXPERIMENTAUX.

1. TABLEAUX DES TAUX D'ANTICORPS.

2. LES COURBES D'IMMUNISATION.

Cinquième partie :

ANALYSE ET DISCUSSION DES RESULTATS.

1. ANALYSE DES RESULTATS.

1.1. Analyse des résultats du premier lot de lapins.

1.2. Analyse des résultats du deuxième lot de lapins.

1.3. Analyse des résultats du troisième lot de lapins.

1.4. Analyse des résultats du quatrième lot de lapins.

2. INTERPRETATION STATISTIQUE DES RESULTATS.

3. DISCUSSION.

3.1. Les facteurs biogaléniques.

3.1.1. Les facteurs liés à la fusion des suppositoires.

3.1.2. Les facteurs liés à la formulation.

3.1.2.1. Les facteurs liés aux principes actifs.

3.1.2.2. Les facteurs liés à l'excipient.

3.1.2.3. Les facteurs liés aux interactions excipient/principe actif et principe actif/principe actif.

3.1.3. Essai de comparaison générale des excipients utilisés en fonction de la biodisponibilité des antigènes contenus dans les suppositoires.

3.2. Les facteurs immunologiques.

CONCLUSION.

Première Partie

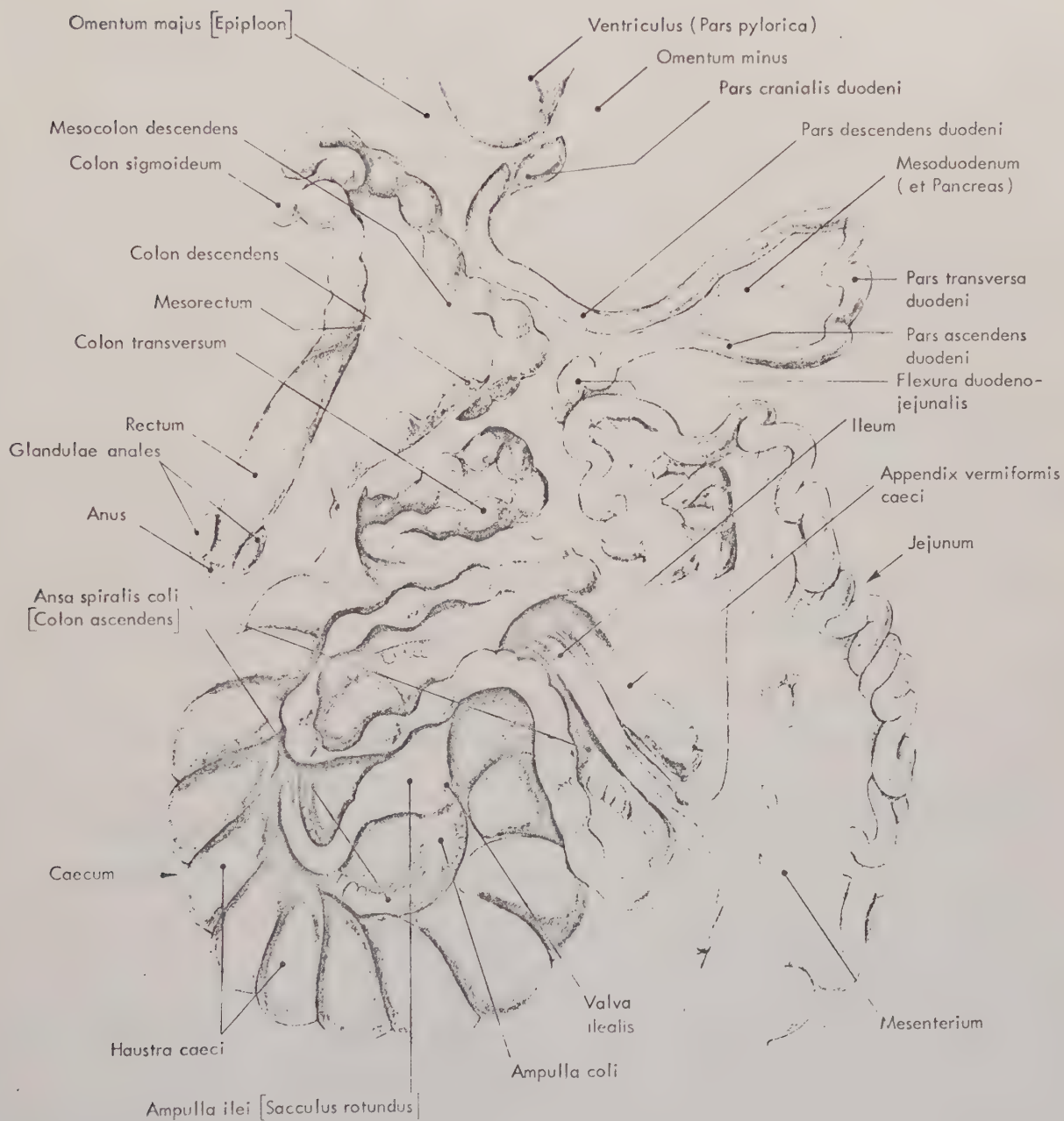
RAPPEL SUR LE SYSTEME LYMPHOÏDE DU LAPIN

Le lapin constitue un matériel d'étude fréquent dans plusieurs domaines tels que la physiologie, la pharmacologie, la pathologie expérimentale, la pharmacie galénique, l'immunologie, etc...

Mais la documentation biologique à son sujet reste insuffisante. Un seul ouvrage - BARONE et coll. (6) - nous a permis d'avoir une idée précise sur la disposition anatomique des organes nous intéressant, et en particulier sur le système digestif du lapin (voir schéma N° 1).

Dans notre étude, nous ne nous intéressons qu'au système lymphoïde intestinal du lapin et au rôle de ce système dans le développement de l'immunité. Notons qu'au niveau du rectum, il existe une riche vascularisation : "les veines sont particulièrement nombreuses et variqueuses, les lymphatiques se collectent dans une chaîne de petits ganglions accolés aux vaisseaux" (91).

1. - SCHEMA GENERAL DU SYSTEME DIGESTIF DU LAPIN



INTESTINUM TENUE ET INTESTINUM CRASSUM.

Intestin isolé et étalé après dissociation des diverses portions.

Intestine, removed and dissected : the different parts have been pulled apart.

2. - DESCRIPTION DU SYSTEME LYMPHOÏDE INTESTINAL

DU LAPIN

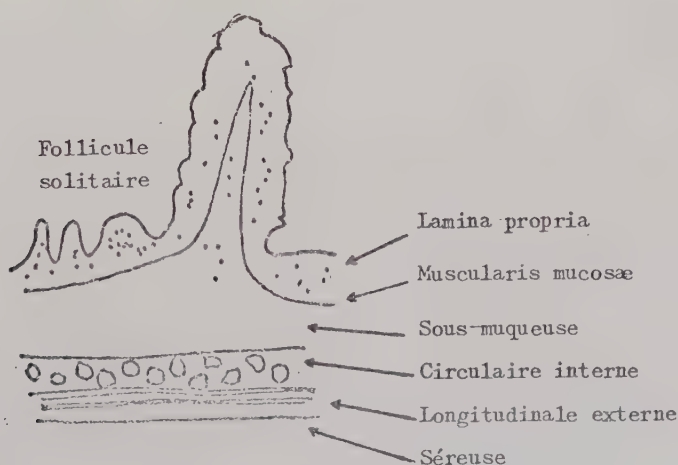
2.1. DESCRIPTION GENERALE -

Les documents dont on dispose sur le système lymphoïde intestinal du lapin sont peu nombreux.

La muqueuse intestinale comporte dans sa structure :

- 1 épithélium formé par une seule rangée de cellules cylindriques à plateau cuticulaire strié, entremêlées de cellules calciformes ;
- 1 chorion conjonctif à mailles lâches, riche en vaisseaux, la lamina propria, contenant dans sa profondeur une muscularis mucosae ;
- 1 appareil glandulaire constitué principalement par les glandes de Lieberkühn et les "goblets cells".

La face interne libre de la muqueuse offre un aspect velouté dû à la présence d'une infinité de microvillosités et villosités. Elle est limitée extérieurement par une sous-muqueuse, elle-même en rapport avec deux couches musculaires revêtues extérieurement par une séreuse.



Des cellules lymphoïdes polymorphes isolées sont dispersées au sein de la lamina propria, mais le plus souvent, ces cellules se trouvent réunies en follicules ou nodules lymphatiques qui se présentent soit solitaires, soit agminés en plaques gaufrées ou plaques de Peyer.

2.2. LES IMMUNOCYTES de la muqueuse intestinale se présentent sous la forme d'une cellule ovale à cytoplasme abondant et à noyau excentré, la chromatine est réunie en mottes à la périphérie du noyau.

Cette cellule présente tous les caractères morphologiques d'une cellule apte à la synthèse, avec un appareil de Golgi et un ergastoplasme très développés, ainsi que de très nombreux polysomes. Le produit de sécrétion permet de distinguer différentes classes d'immunocytes correspondant aux différentes classes d'immunoglobulines sécrétées, et CRANDALL et coll. ont pu en faire l'inventaire au niveau du duodénum du lapin normal (24).

Les plasmocytes à IgA de la lamina propria se retrouvent spécialement au niveau des villosités, souvent réunis en plages. On en retrouve également un nombre important dans le tissu conjonctif plus profond au voisinage des cryptes.

Les plasmocytes à IgG et IgM se retrouvent épars dans la lamina propria, avec cependant une prédominance pour la sous-muqueuse.

Cette disposition semble se retrouver tout le long du tractus intestinal du lapin normal.

2.3. LES FOLLICULES OU NODULES LYMPHATIQUES -

Chaque follicule est constitué d'un tissu lymphoïde dense comportant des centres germinatifs entourés de larges couronnes circulaires de cellules, elles-mêmes contournées par un petit sinus efférent.

A l'aide de techniques de marquage à la thymidine tritiée révélant la synthèse du DNA, la structure du follicule des organes lymphoïdes intestinaux a été bien étudiée par MEUWISSEN et coll. en 1969, chez le lapin (60).

Ces follicules sont extrêmement nombreux, bien plus que dans tout autre organe lymphoïde périphérique, et présentent également une structure particulière les différenciant des organes lymphoïdes périphériques. Celle-ci comprend deux zones distinctes, une zone corticale et une zone médullaire ayant deux populations de lymphocytes différentes : dans le cortex les cellules sont grandes et le noyau a une chromatine lâche, tandis que dans la zone médullaire les cellules sont plus petites et ont un noyau à chromatine plus sombre et plus condensée.

Les cellules du cortex incorporent une quantité de thymidine significativement plus importante que les cellules de la médullaire.

Les follicules dans l'appendice, le sacculus ou les plaques de Peyer, s'étendent sous la surface de la muqueuse et ne présentent pas le manchon lymphatique de petits lymphocytes, caractéristique des follicules des ganglions de la rate.

L'incorporation de la thymidine tritiée révèle que ces follicules sont le siège d'une intense prolifération cellulaire, bien supérieure à celle des autres tissus lymphoïdes, à l'exception de la moelle osseuse.

Ce qui suggère que chez le lapin, les organes lymphoïdes associés à l'intestin assurent le développement d'une population lymphocytaire importante par une rapide prolifération et peuvent jouer un rôle d'organe central.

2.4. LES PLAQUES DE PEYER -

Les plaques de Peyer sont constituées d'amas folliculaires, plus ou moins dures, sensibles au toucher et facilement isolables. A leur alentour, on distingue de nombreuses cellules isolées dont la présence résulte d'une migration cellulaire importante.

La répartition des plaques de Peyer le long du tractus intestinal du lapin est particulièrement caractéristique :

- au niveau de l'intestin grêle, se trouvent environ une dizaine de plaques de Peyer et, en plus, il en existe une très développée dans le sacculus rotundus ;
- au niveau du caecum, on estime que la muqueuse présente des follicules isolés extrêmement nombreux, mais qu'il n'y a pas de plaques de Peyer, tandis que la muqueuse du côlon serait moins riche en follicules et dépourvue en plaques de Peyer.

Le rectum, chez le lapin, n'est pas un segment individualisé sous forme d'ampoule rectale comme il l'est chez l'homme. Malgré le nombre très important d'études concernant l'absorption rectale qui ont été pratiquées chez le lapin, il ne semble pas que la structure lymphoïde de celle-ci ait été spécialement étudiée.

On admet couramment qu'elle participe à celle du côlon puisque le rectum représente anatomiquement la partie distale du côlon, sauf au niveau du sphincter.

La muqueuse rectale comporte donc un système lymphoïde réduit, représenté par des cellules éparses dans la lamina propria et des follicules clos isolés, mais dépourvu de plaques de Peyer.

2.5. L'APPENDICE vermiculaire, très développé, représente un organe lymphoïde important.

La structure de l'appendice présente une zone épithéliale qui recouvre une zone lympho-épithéliale nodulaire. Cette zone est constituée de très nombreux follicules disposés au voisinage des cryptes de Lieberkühn. Ces follicules présentent des centres germinatifs très actifs - FRIENDENSTEIN, 1965 (36) - et sont le point de départ d'une importante migration de lymphocytes B. Les lymphocytes sont retrouvés nombreux au niveau de l'épithélium qui assure le contact avec la zone intestinale septique, source d'antigènes. Des cellules histiocytaires macrophagiques, pas très nombreuses semble-t-il, sont présentes dans les follicules et assurent la captation des antigènes. Des zones thymo-dépendantes extra-folliculaires ont été également mises en évidence - A. POMPIDOU, 1972 (74) - et la présence de cette double population lymphocytaire B et T est témoin de l'activité immune de l'appendice.

3. - ROLE DU SYSTEME LYMPHOIDE INTESTINAL DANS LE DEVELOPPEMENT DE L'IMMUNITE

HARRIS et coll. en 1948 (44) ont, semble-t-il, les premiers, montré le rôle du thymus et de la rate dans la formation des anticorps chez le lapin, puis le rôle du thymus dans le développement de l'immunité chez cet animal a été bien précisé par les travaux de GOOD et coll. en 1962 (39) : la thymectomie pratiquée cinq jours après la naissance perturbe la distribution des cellules lymphoïdes dans les organes périphériques et se traduit par une réduction dans la production d'anticorps. Chez l'animal plus âgé, ces mêmes auteurs ont montré que le thymus jouait un rôle essentiel dans le rétablissement des fonctions immunologiques après irradiation.

3.1. MECANISME DE SYNTHESE DES ANTICORPS -

Cependant, l'étude approfondie du système lymphoïde intestinal du lapin par SUTHERLAND et coll. en 1964 (90) a montré le rôle primordial que joue l'appendice dans le développement de la fonction immunologique dans cette espèce, tandis que ARCHER et coll. (2), la même année, montraient que le développement de cette fraction pouvait être indépendant du thymus. THORDEBECK (93) avait d'ailleurs rapporté précédemment que le développement du tissu lymphoïde de l'appendice était très rapide et que celle-ci pouvait induire la synthèse d'anticorps chez le lapin âgé d'une semaine, alors que les autres organes lymphoïdes n'avaient pas encore acquis la capacité de le faire.

PEREY et coll., 1968 (72), montrent par contre que le développement de l'appendice demande le contact avec les substances présentes dans le contenu intestinal.

Si l'appendicectomie n'affecte pas la capacité de faire des anticorps chez le lapin adulte, l'appendicectomie néonatale entraîne une incapacité de synthétiser des anticorps, comme l'ont montré successivement ARCHER et coll. en 1964 (2), DRAPER et SUSSERDOFF en 1965 (27), et COOPER et coll. en 1967 (19):

Dans une étude comparée des rôles respectifs du thymus et de l'appendice chez le lapin, à l'aide de protocoles comportant thymectomie, appendicectomie et irradiation, KONDA et HARRIS, en 1966 (54), sont amenés à préciser la manière primordiale dont intervient l'appendice dans la synthèse des anticorps antiprotéiques. PEREY et COOPER, en 1968 (72), confirment son rôle dans celle des anticorps antiparticulaires (bactéries Gram négatif ou globules rouges de mouton).

HANAOKA et coll., en 1970 (43), pensent pouvoir attribuer un rôle préférentiel à l'appendice dans la synthèse des IgM au cours de la réponse primaire, mais un rôle mineur dans la réponse de type secondaire en IgG. Et selon eux, la réponse en IgG chez le lapin serait essentiellement sous la dépendance de la moelle osseuse.

3.2. LIEU DE SYNTHÈSE DES ANTICORPS -

Les observations faites par SUSSERDOFF en 1960 (89) et FRIEDENSTEIN en 1965 (36) avaient montré un taux de cellules en prolifération extrêmement important dans les centres germinatifs des follicules intestinaux, mais que les lymphocytes produits semblaient migrer vers l'épithélium appendiculaire et vers les follicules de rate et des autres organes lymphoïdes périphériques.

D'ailleurs, l'existence d'une telle migration pouvait expliquer le fait que l'appendicectomie néonatale

s'accompagnait d'une diminution dans la formation des centres germinatifs à l'intérieur de la rate et des ganglions lymphatiques (2).

La formation des anticorps induite par l'appendice semble effectivement ne pas avoir lieu dans l'appendice même. HANAOKA et coll., 1970, en injectant des antigènes directement dans la lumière de l'appendice ou dans l'artère appendiculaire, ont confirmé ce que COOPER et coll., 1967 (19), avaient suggéré, que les anticorps ne se forment pas directement dans les sites folliculaires de l'appendice, mais que les migrations cellulaires, après administration d'antigènes, conduisent les lymphoïdes aux centres germinaux des ganglions lymphatiques et de la rate où la synthèse proprement dite a lieu. Là, la présence de cellules provenant de la moelle assurerait la réalisation de la synergie moelle osseuse/appendice, qui permettrait la synthèse des anticorps, puis que les cellules originaires de la moelle semblent absentes au niveau des plaques de Peyer chez le lapin - OZER et WAKSMAN, 1970 (69). Cependant, HENRY et coll. (45) étudiant in vitro le comportement immunologique de cellules provenant d'un pool de plaques de Peyer, leur trouvent une capacité de réponse à une stimulation identique à celle de cellules provenant de la rate.

3.3. ROLE DE LA COOPERATION CELLULAIRE DANS LA SYNTHÈSE DES ANTICORPS -

Ceci met en évidence la complexité du système immunologique intestinal qui se traduit par la présence, au niveau des follicules, d'une double population de lymphocytes :

- Lymphocytes T dont la présence et le caractère fonctionnel ont été mis en évidence par les études de ASTALDI, 1969 (4), puis confirmés en 1971 par KAGNOFF (53) et RAFF (75).

A côté d'une sous-population impliquée dans l'hypersensibilité retardée, des cellules dites "Helper cells" pourraient intervenir dans la formation des anticorps par activation des lymphocytes B - MILLER (61).

- Lymphocytes B responsables de l'élaboration des anticorps. On les retrouve soit sous forme de cellules précurseurs, soit sous forme de plasmocytes. Soumis à une stimulation antigénique importante, les lymphocytes B assureraient seuls la formation des anticorps, mais devraient être activés par les "Helper cells" en cas de stimulation faible.

Le caractère fonctionnel de ces lymphocytes B a été étudié par la mise en évidence à leur surface de récepteurs à IgG, à la phyto-hémagglutinine et à la concanavaline - DAGUILLARD et coll., 1969 (25), CALKINS et coll., 1975 (14) - ainsi que par la présence sur leur membrane de récepteurs pour le complément - ELFENBEIN et coll., 1973 (30).

L'étude combinée de ces trois marqueurs de lymphocytes B a permis à CALKINS et coll., 1975 (14), de dénombrer les cellules B dans l'appendice du lapin et de suggérer que l'appendice pourrait être non seulement un lieu de prolifération, mais de maturation cellulaire : recevant des cellules avec peu ou pas de récepteurs, elle leur permettrait de "mûrir" et de proliférer avant de les exporter vers les ganglions mésentériques, le sang et la rate.

On semble admettre que les lymphocytes T et B se trouvent en rapport de 25 et 75 % dans les organes lymphoïdes intestinaux du lapin - CRAIG et CEBRA (22). Les données, tant embryologiques que morphologiques et fonctionnelles, suggèrent que, organes mixtes, les plaques de Peyer font du système lymphoïde intestinal du lapin un organe lymphoïde primaire, éducateur de cellules B, et un organe lymphoïde secondaire, producteur de cellules sécrétantes.

La tendance actuelle est de penser que, chez le lapin, l'équivalence de la bourse de Fabricius est représentée par l'association moelle osseuse/plaques de Peyer, mais que, de plus, les plaques de Peyer doivent être mises sur le même plan et fonctionnellement associées aux ganglions et à la rate comme organes producteurs d'anticorps.

Le caractère fonctionnel des lymphocytes B présents dans les organes intestinaux a été étudié et comparé à celui des lymphocytes B provenant d'organes secondaires bien définis comme les ganglions lymphatiques : à l'aide de protocoles de transfert, CRAIG et CEBRA (22) confirment la présence de lymphocytes B capables d'induire des plasmocytes à IgG, IgM et IgA, mais récemment (23), en analysant les composants des immunoglobulines des membranes de ces lymphocytes B, ils mettent en évidence que les cellules B des plaques de Peyer et de l'appendice sont pour la plus grande majorité précurseurs de plasmocytes à IgA, tandis que les cellules B des ganglions sont essentiellement des cellules à IgM et IgG.

Chez le lapin normal, les résultats obtenus par CRAIG et CEBRA au cours de leur étude des lymphocytes des plaques de Peyer et de l'appendice font ressortir la prédominance des cellules à IgA comme les études de CRANVALL (24), de GELZAYD (38), l'avaient montré au niveau des lymphocytes de la lamina propria, puisque la population cellulaire y est représentée par 80 à 90 % de cellules à IgA, 6 à 11 % de cellules à IgG et 1 à 3 % de cellules à IgM. Ces auteurs avaient également relevé dans les ganglions lymphatiques l'inversion de ces proportions relatives puisqu'ils y retrouvaient 64 à 82 % de cellules à IgG, 17 à 27 % de cellules à IgM et seulement 2 à 9 % de cellules à IgA.

Chez le lapin infecté, comme l'ont montré CRANVALL et coll. dans une trichinose expérimentale (24), apparaît d'abord une élévation du nombre des cellules à IgM, suivie

de celle des cellules à IgG, tandis que chez l'animal surinfecté, seule persiste l'élévation des cellules à IgG, mais ces variations se font toujours face à une population de cellules à IgA très largement dominante.

3.4. LES IMMUNOGLOBULINES DU LAPIN -

Les immunoglobulines de lapin, et en particulier l'IgA sécrétoire qui représente la sécrétion principale des plasmocytes intestinaux, ont été étudiées par CEBRA et ses collaborateurs (16, 17).

D'après CEBRA, 1969 (15), le poids moléculaire de l'IgA 11 S du lapin, dimère de l'IgA 7 S, serait de 385.000 avec 4 chaînes lourdes α de poids moléculaire 64.000 et 4 chaînes légères κ ou λ de poids moléculaire $\neq$ 22.000

Des études plus récentes, tant sur les IgA S humaines que celles du lapin - HALPERN (42), BIENENSTOCK (7), BRANDZAEG (10), VAERMAN (95) -, ont permis de préciser les conditions de synthèse et ont confirmé les travaux de CEBRA et ODALY, 1968, qui suggéraient que la synthèse des IgA S du lapin se faisait en deux étapes et se terminait au niveau de l'épithélium de la muqueuse par la jonction au dimère (α L) 2 - J d'une pièce de "transport" reconnue actuellement comme la composante sécrétoire.

L'étude de la structure primaire de l'IgA S a permis de préciser l'existence de séquences de peptides caractéristiques et leur composition en acides aminés, et la détermination des zones constantes et zones variables.

Les autres immunoglobulines sécrétées par les plasmocytes intestinaux IgG et IgM présentent les mêmes caractéristiques que les IgG et IgM sériques et ont participé à

l'étude générale faite sur les immunoglobulines humaines et animales, et sont connues dans l'intimité de leur structure.

Plus récemment, on a pu mettre en évidence, dans la muqueuse intestinale du lapin comme dans celle de l'intestin humain, la présence de plasmocytes à IgE - ROTHBERG et coll., 1973 (84).

C'est sur les immunoglobulines de lapin que OUDIN (68) a découvert la notion d'allotypie, liée à la présence de différences très fines (appelées marqueurs) sur les immunoglobulines de certains individus d'une même espèce.

Le lapin possède plusieurs spécificités allotypiques réparties sur les différentes molécules d'immunoglobulines.

L'existence et la localisation précise des marqueurs et en particulier des marqueurs a et b sur les chaînes α , γ , μ , des marqueurs d et e sur les chaînes α , mais aussi sur le fragment FC des IgA S et sur les chaînes κ , ont pu être mises en évidence - TODD, 1974 (94).

Les études très poussées qui sont faites actuellement de l'allotypie chez le lapin contribuent à la connaissance du système immunitaire dans ses mécanismes les plus profonds, mécanismes de synthèse des immunoglobulines, nature génétique de la réponse immune.

L'activité biologique des IgL de lapin dépend de la classe à laquelle elles appartiennent.

Les IgG sécrétoire ou sérique ont une activité bactérienne liée au complément et sont douées de pouvoir opsonisant.

L'IgA sécrétoire montre une activité neutralisante et protectrice, mais pas d'activité opsonisante - EDDIE et coll., 1971 (29).

3.5. RESUME -

L'immunité intestinale se développe suivant le schéma suivant : l'antigène atteint la muqueuse intestinale du lapin, pénètre dans la muqueuse selon des phénomènes d'absorption divers dépendant de sa structure, entre en contact avec les follicules lymphatiques isolés ou réunis en organes lymphoïdes (plaques de Peyer). Soumis à la stimulation antigénique, ces follicules lymphatiques seront à l'origine d'une réponse immune locale représentée essentiellement par des immunoglobulines sécrétoires IgA S. Ils induiront également une réponse immune générale humorale : en effet, la prolifération cellulaire intense dont ils sont le siège donne naissance à des cellules précurseurs qui migreront vers les ganglions mésentériques et la rate où elles donneront lieu au développement d'une population plasmocytaire nombreuse, élaboratrice d'IgG, IgM et IgA sériques. L'importance relative de ces deux réponses dépendra de la nature de l'antigène stimulant et, dans le cas de bactéries et de virus, s'ils sont vivants ou tués.

La réponse immune cellulaire consécutive à une stimulation antigénique intestinale existe, mais elle est encore mal connue.

Deuxième Partie

LES COMPOSANTS DE LA FORME GALENIQUE

1. - LES ANTIGENES UTILISES

1.1. GENERALITES SUR LES ANTIGENES -

1.1.1. Définition :

"On appelle antigène toute substance capable de réaction spécifique avec les cellules lymphoïdes ou leurs produits spécifiques". (20).

L'antigène est immunogène lorsqu'il induit dans un organisme une hypersensibilité spécifique et/ou la production d'anticorps.

Immunogénicité et antigénicité sont deux propriétés différentes :

- l'immunogénicité correspond à l'induction d'une réponse spécifique, alors que l'antigénicité correspond à la capacité de réaction de l'antigène avec les anticorps correspondants aptes à s'unir à une ou plusieurs fractions de l'antigène désignées par les termes de motifs antigéniques ou déterminants.

1.1.2. Propriétés générales des antigènes :

L'immunogénicité est conditionnée par les caractères physico-chimiques de la molécule d'antigène :

- un antigène doit être constitué d'une "molécule volumineuse", il est d'autant plus immunogène que son poids moléculaire est plus élevé (20) :

		Poids moléculaire	Immunogénicité
PROTEINES	Glucagon.....	3.000	mauvais antigènes
	ACTH		
	Albumine.....	70.000	bons antigènes
	Immunoglobuline	160.000	
	Thyroglobuline.	650.000	très bons antigènes
	Hémocyanine....	6.500.000	
GLUCIDES	Dextrines polymères du D-glucose :		
	- Polymères....	> 10.000	bons antigènes
	- Polymères....	10.000 - 50.000	antigènes faibles

- s'il est protéique : la présence dans la molécule protéique d'acides aminés aromatiques tels que la tyrosine augmente l'immunogénicité. Ainsi la gélatine (1 % de tyrosine), quoique possédant un poids moléculaire élevé, est un mauvais antigène, par contre l'amylase porcine - poids moléculaire : 53.000 - montrant 18 résidus de tyrosine, 9 résidus d'histidine, est un très bon antigène.

1.1.3. La spécificité antigénique :

Il existe des déterminants antigéniques situés à la surface de la molécule et qui permettent la réaction antigène-anticorps, et un changement même léger de la molécule peut entraîner la modification ou l'altération de l'antigénicité. Cependant, dans certains

cas, il est possible de modifier l'activité biologique d'une molécule sans altérer son antigénicité : c'est ainsi que l'action ménagée de la chaleur et du formol peut supprimer la toxicité des toxines sans altérer l'antigénicité (préparation des anatoxines).

Le déterminant antigénique est lié à la structure de la molécule :

- Dans le cas des protéines, le déterminant peut être de type séquentiel ou conformationnel :

- . Le déterminant séquentiel est sous la dépendance de la structure primaire de la molécule :

le déterminant peut être constitué par des acides aminés à disposition séquentielle sur un peptide fibrillaire,

le déterminant peut être aussi constitué par tel ou tel acide aminé qui conditionne l'immuno-génicité.

- . Le déterminant conformationnel est sous la dépendance de la structure secondaire, tertiaire ou quaternaire de la molécule. Sans entrer dans les détails, notons que la richesse de la molécule antigénique en déterminants est fonction de son poids moléculaire (20) :

	Poids moléculaire	Nombre de déterminants
Ribonucléase.....	13.000	3
Ovalbumine.....	44.000	5
Sérum albumine....	66.000	6 - 8
<u>Toxine tétanique..</u>	69.000	8
<u>Toxine diphtérique</u>	72.000	8 - 12
Thyroglobuline....	650.000	40
Hémocyanine.....	6.500.000	75 - 231

1.2. NATURE ET CARACTERISTIQUES DES ANTIGENES UTILISES -

La nature, les propriétés physico-chimiques, la dimension des particules du principe actif, jouent un rôle prépondérant dans sa biodisponibilité ; nous avons jugé utile de connaître les antigènes utilisés pour être en mesure de mieux définir certains facteurs qui s'exercent sur leur libération et leur absorption.

Nous avons utilisé comme matière première le vaccin commercial injectable^(*) antidiphtérique-antitétanique-anti-Salmonella typhi et paratyphi A et B, connu sous le nom de D.T.T.A.B., dont la formule est la suivante :

- Anatoxine diphtérique.....	30 Lf
- Anatoxine tétanique.....	12,5 Lf
- Salmonella typhi (tués par la chaleur).....	425 millions
- Salmonella paratyphi A (tués par la chaleur)	150 millions
- Salmonella paratyphi B (tués par la chaleur)	275 millions
- Ethyl-mercuri-thiobenzoate de sodium.....	0,1 o/oo
- Soluté isotonique de ClNa q.s.p.....	1 ml

Ce vaccin polyvalent comporte des antigènes bactériens de deux types :

- des antigènes constitutifs de Salmonella typhi et paratyphi A et B tués par la chaleur ;
- des anatoxines bactériennes de bacille diphtérique et tétanique.

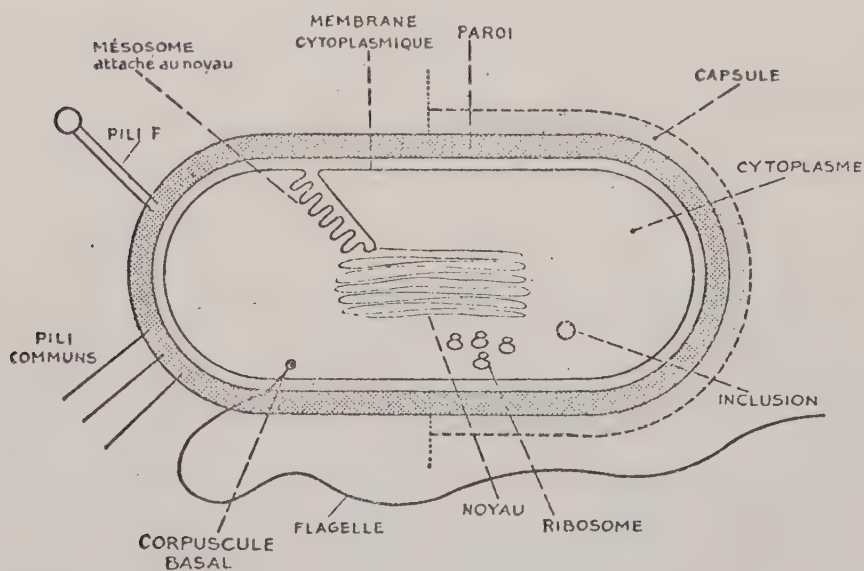
On examinera en détail la nature, les propriétés et la structure de chacun des antigènes.

(*) Vaccin de l'Institut Pasteur de Paris.

1.2.1. Les antigènes constitutifs :

Dans notre cas, ce sont les antigènes pariétaux et flagellaires de *Salmonella typhi* et paratyphi A et B. Le schéma suivant montre la structure antigénique d'une cellule bactérienne, ce qui nous permettra de situer nos deux types d'antigènes.

- STRUCTURE D'UNE CELLULE BACTERIENNE -



- Schéma N° 3 -

Les *Salmonella* appartiennent à la famille des entérobactériacées, ce sont des bacilles droits de $0,5 \mu$ de large sur 3μ de long, non capsulés, mobiles grâce à des cils péritriches.

Les *Salmonella* sont colorables par les colorants d'aniline, ils sont Gram négatif, la ciliation péritriche est mise en évidence par la coloration de Leifson.

1.2.1.1. Les antigènes somatiques :

Nous ne considérons que l'antigène somatique O car c'est le plus important, on ne le trouve que dans les formes lisses S :

- il est thermostable,
- il est détruit par le formol,
- il résiste à l'alcool et à l'acide phénique.

C'est un antigène pariétal constitué par un complexe lipo-polysaccharidique formé par :

- un polyoside phosphorylé : longue chaîne d'unités heptose phosphate,
- une protéine,
- et des lipides : les uns appelés lipides A fortement attachés au complexe, et les autres appelés lipides B facilement extractibles.

Dans ce complexe, la protéine est responsable du pouvoir antigénique, le polyoside de la spécificité et le lipide A de la toxicité (62).

La spécificité sérologique du polyoside est due à la structure des chaînes latérales qui est caractéristique de chaque sérotype de Salmonella.

1.2.1.2. L'antigène flagellaire H :

L'antigène H

- est thermolabile, détruit par la chaleur à 100°C,
- résiste au formol,
- détruit par l'alcool et le ferment protéolytique.

L'antigène H est de nature protéique, ce sont des molécules de protéine fibreuse. Les déterminants de leur spécificité ne sont pas connus. C'est une protéine

complexe, dénommée flagelline par ASTROMG et coll., constituée par 14 acides aminés courants, à l'exception de la cystéine, et d'un poids moléculaire = 20.000 à 40.000 selon l'espèce.

1.2.2. Les anatoxines diphtérique et tétanique :

Nous savons que les toxines bactériennes sont transformées en dérivés immunogènes atoxiques sous l'action du formol (anatoxines - formol ; formol - toxoïdes). Les anatoxines obtenues ont la même composition chimique que les toxines correspondantes et la perte de la toxicité résulte d'une modification de l'architecture de la molécule par l'action du formol.

Nous décrirons en détail la nature et la structure des toxines diphtérique et tétanique, puis nous étudierons le mécanisme de leur détoxification.

1.2.2.1. La toxine diphtérique :

C'est une exotoxine sécrétée par *Corynebacterium diphteriae* au cours de la phase de croissance de celle-ci. C'est une simple protéine qui contient (51) :

- 16 % d'azote,
- 0,05 % de phosphore,
- 0,75 % de soufre,
- ne contient pas d'hydrate de carbone,
- ne contient pas de lipides,
- les amino-acides qui constituent cette protéine sont représentés dans le tableau N° 1 d'après M. RAYNAUD, B. BIZZINI et E.H. RELYVELD (79),
- le point iso-électrique est compris entre 4,5 et 4,9,
- son poids moléculaire = 65.000 à 72.000.

Notons que la toxine diphtérique ne contient pas de groupement sulfhydryle libre et que l'analyse ampérométrique de la toxine réduite par le sulfite de sodium ou par le borohydrure de sodium a conduit à admettre l'existence, dans la molécule de toxine, de deux ponts disulfures par mole (79).

- Tableau N° 1 -

COMPOSITION EN AMINO-ACIDES
DE LA TOXINE DIPHTERIQUE

Amino-acides	Gramme d'amino-acides pour 100 g de protéine poids sec	Poids moléculaire minimum basé sur un résidu AA/mole	Nombre minimum de résidus AA par mole	Poids moléculaire minimum basé sur n résidus AA/mole	p. 100 corrigé
Ac. aspartique	12,53	1.062	61	64.782	12,58
Thréonine	6,13	1.943	33	64.119	6,09
Sérine	8,43	1.247	52	64.844	8,47
Ac. glutamique	13,34	1.103	58	63.974	13,22
Proline	3,64	3.163	20	63.260	3,57
Glycine	4,63	1.619	40	64.760	4,65
Alanine	5,16	1.727	37	63.899	5,11
Cystine 1/2	0,75	16.133	4	64.532	0,75
Valine	7,39	1.585	41	64.985	7,43
Méthionine	1,76	8.478	8	67.824 (*)	1,85
Isoleucine	6,73	1.949	33	64.317	6,70
Leucine	7,67	1.710	38	64.980	7,72
Tyrosine	4,70	3.855	17	65.535	4,77
Phénylalanine	4,20	3.933	17	66.861	4,35
Lysine	9,05	1.615	40	64.600	9,05
Histidine	3,96	3.918	16	62.688	3,85
N amidé	1,26				1,26
Arginine	4,09	4.254	15	63.810	4,05
Tryptophanne	1,04	19.615	3	58.486 (*)	0,95
Total	106,46			64.497	106,42

(*) Ces valeurs n'ont pas été utilisées pour le calcul du poids moléculaire moyen.

1.2.2.2. La toxine tétanique :

Exotoxine sécrétée par les souches virulentes de *Plectridium tetani*, c'est une simple protéine qui contient (52) :

- 15,7 % d'azote,
- 0,065 % de phosphore,
- 1,04 % de soufre,
- ne contient pas d'hydrate de carbone,
- ne contient pas de lipides,
- les amino-acides qui constituent cette protéine sont représentés dans le tableau N° 2 d'après W.E. VAN HEYNINGEN et J. MELLANBY (52),
- le point iso-électrique est compris entre 5,0 et 5,2,
- la toxine commence à précipiter et à perdre son activité au pH 6, mais elle est stable à pH 5 en présence de glycérine,
- son poids moléculaire = 150.000.

Notons que des techniques d'ampérométrie et de spectrophotométrie ont montré que la toxine tétanique possède 6,2 groupements sulfhydryles libres^(*) (79).

3,2 de ces groupements sont directement accessibles sur la molécule, les 3,0 autres groupements sont masqués, ne pouvant être mis en évidence qu'après dénaturation. Après blocage de tous les groupements sulfhydryles libres de la toxine, on a obtenu, par action du sulfite ou par réduction par le borohydrure de sodium, un nombre de -SH correspondant à l'existence de 1,92 à 1,75 ponts disulfures.

(*) Valeurs exprimées pour un poids moléculaire arbitraire de 100.000.

- Tableau No 2 -

AMINO ACID ANALYSES OF VARIOUS PREPARATIONS OF PURIFIED TETANUS TOXIN

Amino acid	Molecular weight amino acid - molecular weight - water (residue weight) (A)	Amino acid residue (gm residue/100 gm toxin)				Gram molecules amino acid		Minimum amino acid residues per molecule	Probable amino acid residues per monomer (C)	Molecular weight of monomer (100 A/C/B)
		Dunn <i>et al.</i> Bizzini (1949) ^a	(1964) ^b	(1967) ^c	Mean (B)	residue per 100 gm toxin (B/A)	residue per 100 gm toxin (B/A)			
Alanine	71.07	-	4.09	2.75	3.42	0.0481	0.0481	10.55	32	66,498
Arginine	156.18	3.38	4.23	3.86	3.82	0.0245	0.0245	5.36	16	65,416
Aspartic acid	115.08	15.10	14.35	17.26	15.57	0.1353	0.1353	29.67	89	65,781
½ Cystine	102.13	-	0.99	0.71	0.85	0.0083	0.0083	1.82	5	60,076 ^d
Glutamic acid	129.11	10.30	12.07	9.66	10.68	0.0827	0.0827	18.14	54	65,280
Glycine	57.05	3.34	3.60	2.78	3.24	0.0568	0.0568	12.45	37	65,150
Histidine	137.14	1.15	1.31	1.25	1.24	0.0090	0.0090	1.98	6	66,358
Isoleucine	113.15	9.30	7.73	9.26	8.76	0.0774	0.0774	16.98	51	65,875
Leucine	113.15	8.30	8.78	9.02	8.70	0.0769	0.0769	16.86	51	66,329
Lysine	128.17	10.00	9.93	9.55	9.83	0.0767	0.0767	16.82	50	65,193
Methionine	131.19	1.79	2.25	2.11	2.05	0.0156	0.0156	3.43	10	63,995
Phenylalanine	147.17	4.99	4.79	5.36	5.05	0.0343	0.0343	7.52	23	67,028
Proline	97.11	-	3.66	4.04	3.85	0.0396	0.0396	8.69	26	65,581
Serine	87.07	-	5.27	6.05	5.66	0.0650	0.0650	14.25	43	66,149
Threonine	101.10	5.10	4.81	5.63	5.18	0.0512	0.0512	11.23	34	66,359
Tryptophan	186.20	0.82	0.87	-	0.85	0.0046	0.0046	1.00	3	65,718
Tyrosine	163.17	-	6.47	7.58	7.03	0.0431	0.0431	9.45	28	64,989
Valine	99.13	5.40	4.38	3.90	4.56	0.0460	0.0460	10.09	30	65,217
Totals	-	78.97	101.40	100.77	100.34	-	-	-	588	-

Mean molecular weight = 65,701

± 1.1%

Molecular weight (ΣAC) + 18.02 = 65,904

1.2.2.3. Le mécanisme de la détoxification des toxines diphtérique et tétanique :

La détoxification se fait au formol en solution à 4 o/oo pour la toxine tétanique, et en solution à 5 o/oo pour la toxine diphtérique. Ces deux réactions se font sous l'action de la chaleur ménagée à 40°C.

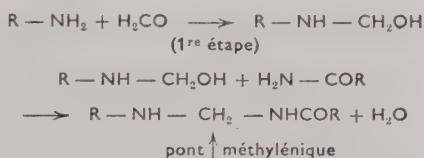
Le mécanisme de la détoxification de ces deux toxines a été étudié par B. BIZZINI et M. RAYMOND et J. BLASS. Ils ont montré que 30 % du groupement $-\text{NH}_2$ de la lysine des toxines diphtérique et tétanique fixent le formol d'une façon résistante à la dialyse et que dans les toxines formolées des liaisons se font entre le groupe $-\text{NH}_2$ de la lysine et le $-\text{CH}$ en ORTHO du carbone portant l'hydroxyle de la tyrosine, formant ainsi des ponts méthyléniques du type "MANNICH".

La fixation du formol sous forme de ponts méthyléniques peut se résumer dans les réactions du tableau suivant (9) :

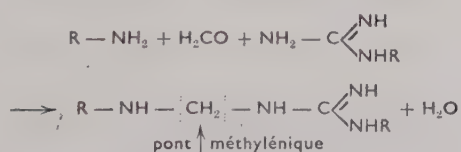
- Tableau N° 3 -

Fixation du formol sous forme d'un pont méthylénique entre:

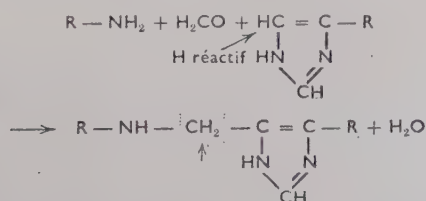
I. — Le groupement aminé et le groupement amidé.



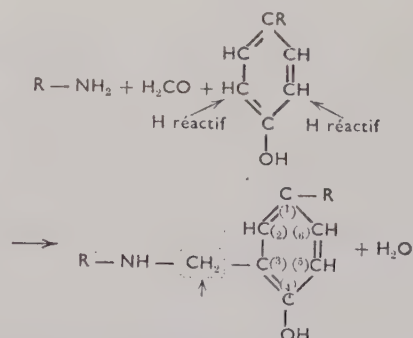
II. — Le groupement aminé et le groupement guanidylé.



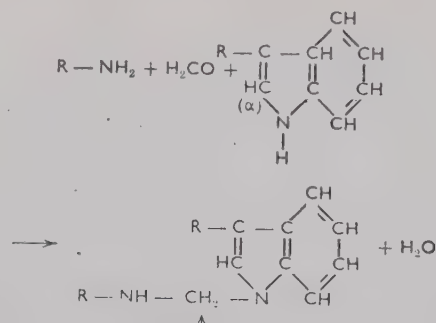
III. — Le groupement aminé et le noyau imidazole.



IV. — Le groupement aminé et le noyau phénolique.



V. — Le groupement aminé et le noyau indol.



2. - LES EXCIPIENTS

2.1. DEFINITION -

Le terme excipient désigne : les substances non médicamenteuses accompagnant le principe actif dans la forme pharmaceutique ; dans le cas des suppositoires, il recouvre donc les bases proprement dites (ou véhicules) et les divers adjuvants (émulsionnants, modificateurs du point de fusion, conservateurs, colorants).

Les termes d'excipient et de base ne doivent pas être confondus avec celui de masse qui désigne le mélange de l'excipient et des principes actifs prêts à la coulée.

2.2. LES BASES - OU VEHICULES :

Ce sont des substances destinées à servir de support aux principes actifs médicamenteux introduits dans l'organisme par voie rectale sous forme de suppositoire ; elles doivent répondre à une série d'exigences relatives à leur fabrication, à leur stockage et à leur utilisation. Disons que ces exigences limitent les bases pour suppositoires à trois grands types :

- les bases fusibles, de nature lipidique, destinées à libérer les principes actifs en fondant à la température du rectum ;
- les bases hydrosolubles qui se dissolvent au contact du mucus de l'ampoule rectale ;
- les bases hydrodispersibles qui se désagrègent dans les mêmes conditions.

Dans les bases fusibles, seuls les glycérides semi-synthétiques nous intéressent dans notre étude.

2.2.1. Fabrication :

Ces excipients sont fabriqués à partir d'huile végétale :

- l'huile de palme extraite du fruit *Elaeis guineensis*,
- l'huile de palmiste provenant de l'amande du même fruit,
- l'huile de coprah obtenue après dessiccation du contenu de la noix de coco : fruit de *Cocos nucifera*.

Ces trois huiles diffèrent par la nature et la proportion des acides gras des glycérides :

- les huiles de palmiste et de coprah renferment une proportion importante d'acide stéarique : près de 50 % ;
- l'huile de palme est constituée principalement d'acide oléique, palmitique et stéarique.

Les modifications chimiques de ces huiles et leur mélanges en différentes combinaisons permettent d'obtenir des bases de qualité différente. Après raffinage poussé de l'huile de palme et de l'huile de coco, on procède :

- à une hydrogénation par voie catalytique (Ni de Raney) qui transforme les chaînes grasses triglycéridiques insaturées en chaînes saturées ;
- à une interestérification des triglycérides dans des conditions telles que l'on obtienne un mélange de mono-, di- et triglycérides d'acide gras saturé. Cette dernière opération entraîne l'apparition de fonctions hydroxyles libres et de propriétés physiques et chimiques particulières (98).

2.2.2. Caractères des différentes variétés :

On obtient ainsi divers excipients du type "Suppocire" (*)

Parmi ces suppocires, nous avons choisi trois variétés : AM, AS₂X et BM, dont les caractéristiques correspondent à celles figurant dans le tableau N° 4.

On peut définir ces trois variétés de suppocire de la façon suivante :

- le suppocire AM est un mélange défini de glycérides d'acides gras saturés obtenus par hydrogénation et interestérification d'huiles végétales naturelles dont la quantité de mono- et diglycérides correspond à l'indice d'hydroxyle donné ;
- le suppocire AS₂X est un mélange défini de glycérides d'acides gras saturés associés à des dérivés poly-oxy-éthylènes de corps gras ;
- le suppocire BM : le même que le suppocire AM, mais se caractérise par certains points (cf. tableau N° 4).

2.3. LES ADJUVANTS DE L'IMMUNITE -

L'incorporation dans l'une des formules de suppositoires d'un adjuvant de l'immunité nous conduit à donner un rappel sur la question des adjuvants de ce type.

2.3.1. Définition :

On peut trouver de nombreuses définitions des adjuvants de l'immunité, Mais en tenant compte des données actuelles sur cette question, PARAF les définit comme suit :

"On appelle adjuvant de l'immunité toute substance capable de modifier l'haptène ou l'antigène en augmentant les propriétés antigéniques, ou de stimuler l'activité des cellules intervenant au cours de la "réponse immunitaire" (70).

(*) Etablissements GATTEFOSSE.

CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES SUPPOCIRES UTILISES

Variétés de suppocire	Plage de fusion	Point de solidification	Indice d'acide	Indice d'iode	Indice d'hydroxyle	Indice de peroxyde	Indice de saponification	OBSERVATION D'ORDRE GALENIQUE
AM	35 - 36,5	26 - 32	< 1	< 2	0 - 5	< 10	230 - 240	Cristallisation rapide permettant l'utilisation d'appareils automatiques à refroidissement.
AS ₂ X	35 - 36,5	26 - 32	< 1	< 2	20 - 30	< 10	215 - 230	Variété hydrophile
BM	36 - 37,5	26 - 32	< 1	< 2	0 - 5	< 10	230 - 240	Fabrications industrielles avec refroidissement par cristallisation rapide.

2.3.2. Les principales substances adjuvantes :

Les adjuvants de l'immunité appartiennent à des groupes biochimiques très variés ; nous n'avons pas l'intention de citer tous les adjuvants utilisés depuis leur découverte par RAMON en 1925, mais d'en décrire les principaux groupes dans un essai de classification rapide. On distingue trois grandes catégories d'adjuvants :

- les adjuvants huileux,
- les adjuvants aqueux,
- les adjuvants extraits de microorganismes ou de plantes.

2.3.2.1. Adjuvants huileux :

Avant FREUND, VALLEE et RINJARD (97) en 1926, RAMON et STAUB (77) en 1935, différentes huiles avaient été utilisées avec succès parmi les substances très diverses employées à l'époque.

FREUND (34) montra l'intérêt des émulsions "eau dans huile" pour une bonne activité adjuvante. La pureté et la composition des agents utilisés jouent un rôle important : plus l'émulsion est visqueuse, plus la réponse en anticorps est élevée.

Le Bayol F, constituant les 85 % de la partie huileuse de l'adjuvant de FREUND, est composé de 42,5 % de paraffine, le reste est constitué de naphtalène.

L'Arlacel A, qui est un ester de l'acide oléique et du mannitol, fait également partie de l'adjuvant de FREUND pour 15 % en tant qu'agent émulsionnant.

VALETTE et ses collaborateurs (96) ont montré qu'un mélange huileux de paraffine fluide et d'huile végétale accroît de façon importante l'activité de vaccins

contre la peste porcine, la fièvre aphteuse, la colibacillose ou la salmonellose.

Les adjuvants huileux ont cependant le grave défaut de provoquer des réactions locales peu supportables et des phénomènes d'hypersensibilité retardée ; ils ne sont donc pratiquement pas employés chez l'homme. Cependant, après purification, certains chercheurs ont réussi à obtenir des produits "inoffensifs" : WOODHOUR, HILLEMANN et coll. (10) ont mis au point "l'adjuvant 65" composé d'Arlacel A et de monostéarate d'aluminium, efficace et non toxique chez l'animal (cobaye, souris) immunisé avec le virus Influenza. HILLEMANN et coll. (47) l'ont ensuite appliqué à l'homme avec succès, et ceci par voie sous-cutanée.

2.3.2.2. Adjuvants aqueux :

On peut grouper ici toutes les substances minérales et les produits tensio-actifs formant des solutions, des pseudo-solutions ou des gels en phase aqueuse, et qui se sont révélés être des adjuvants de l'immunité.

WAROLAX et APRILE (100) ont réalisé une revue des possibilités offertes par les sels d'aluminium.

Le phosphate de calcium, selon RELYVELD et RAYNAUD (81) est également adjuvant.

GALL (37) a étudié systématiquement un grand nombre de substances émulsifiantes et rapporte que beaucoup ont des propriétés adjuvantes : hydroxydes colloïdo-métalliques, l'alginate, la lanoline, les sels d'ammonium quaternaire, les phospholipides, la carboxyméthylcellulose et certaines protéines.

SCHERR et coll. (85) ont étudié plus particulièrement l'alginate de sodium associé à des antigènes solubles ou particuliers. Ils obtiennent, dans la plupart des cas, des résultats identiques, sinon supérieurs à l'adjuvant de FREUND.

2.3.2.3. Adjuvants extraits de microorganismes ou de plantes :

Microorganismes :

L'effet adjuvant attribué à des bactéries fut découvert à l'occasion de l'association de vaccins : RAMON et ZOELLER (78), en 1926, associèrent des bacilles typhiques tués et des anatoxines diphtérique et tétanique et montrèrent que les bacilles avaient une activité adjuvante.

Depuis cette date, nous pouvons distinguer plusieurs étapes dans l'utilisation de microorganismes comme adjuvants :

Tout d'abord, l'emploi de germes entiers tués :

- des BACILLES tels que :

Brucella abortus - RAMON et coll. (76),
E. coli - SHAW et coll. (87).

- des PARVOBACTERIES :

Bordetella pertussis - FINGER et coll. (33).

- des MYCOBACTERIES :

Mycobacterium tuberculosis, introduit par FREUND (35) dans son mélange Bayol-Arlacel A pour décupler l'action adjuvante de ces derniers ; c'est l'adjuvant de FREUND le plus utilisé dans les recherches expérimentales chez l'animal :
Bayol : 85 parties - Arlacel A : 15 parties -
Mycobactéries tuées : 5 mg/ml.

Mycobacterium butyricum,
Mycobacterium phlei - FREUND (34),
Mycobacterium amegmatis,

- des ACTIVOMYCETES :

Corynebacterium parvum,
Corynebacterium anaerobium - RAYNAUD et coll. (80),
Corynebacterium granulosum.

Ensuite, certains s'attachèrent à isoler les principes actifs responsables de l'effet adjuvant :

- Ainsi les CIRES D furent isolées du *Mycobacterium tuberculosis* - WHITE et coll. (101).

TAN NGUYEN DANG et coll. ont étudié les propriétés stimulantes des parois cellulaires de *Corynebactéries* et de *Bacilles* (92).

- Les ENDOTOXINES extraites de germes Gram négatif sont de bons adjuvants : GABRIEL MICHAEL et coll. démontrent une résistance non spécifique chez la souris infectée avec des germes Gram négatif pathogène, après injection d'endotoxines de *Coli*, *Salmonelle* ou *Shigelle*.

JOHNSON et coll. (50), en utilisant des LIPO-POLYSACCHARIDES purifiés de *Salmonella typhi*, *Proteus*, *Serratia marcescens*, *Bordetella pertussis* et *Brucella*, obtiennent une augmentation de la réponse en anticorps vis-à-vis d'antigènes protéiques.

Plus récemment, certains auteurs ont isolé la FRACTION LIPIDE A des lipo-polysaccharides et ont prouvé que c'était une fraction active - ANDERSSON et MELCHERS (1).

FAUVE, dans un article consacré aux immunostimulants bactériens (31), parle des propriétés intéressantes

d'un extrait phospholipidique, non toxique pour l'animal, provenant de germes divers et protégeant contre des infections mortelles de *Listeria*, *Pasteurella pestis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhi* murium et *Pseudomonas aeruginosa*.

- Les POLYSACCHARIDES extraits de germes sont également des adjuvants de l'immunité : ainsi NAKASHIMA, OHTA et coll. (65) ont démontré que le polysaccharide capsulaire de *K. pneumoniae* augmente considérablement la réponse en anticorps chez la souris traitée à la sérum-albumine bovine.
- Enfin, les ACIDES NUCLEIQUES ont montré également des propriétés adjuvantes : MERRITT et JOHNSON (59) ont comparé l'action des endotoxines et des acides nucléiques.

ZEMSKOV (104) a observé une augmentation de la résistance aux infections dues au *Streptococcus equi* chez la souris, après administration d'RNA.

Extraits de plantes :

On peut citer le latex d'Hevea - JACOTOT, (49). Certains extraits de plantes sont des mitogènes, agissant principalement sur les cellules immunocompétentes. C'est le cas de la phytohémagglutinine, extraite de *Phaseolus vulgaris* - STRAUCHEN et coll. (88), de la Concanavaline A, extraite également d'une espèce de *Phaseolus vulgaris*, le *Canavallis ensiformis* - PERSON et MARKOWITZ (73), et du "Pockeweed mitogen" (PWM), lécithine extraite de la racine de *Phytolacca americana* - DOUGLAS et coll. (26).

2.3.3. Hypothèse sur le mécanisme d'action des adjuvants de l'immunité :

Selon le mécanisme d'action, ASHERSON et ALLWOOD (3) distinguent deux groupes d'adjuvants :

- les adjuvants de type I qui ne produisent qu'une augmentation quantitative de la réponse. Ils correspondent aux adjuvants dits locaux : substances inertes ou FREUND incomplet ;
- les adjuvants du type II qui produisent aussi des modifications qualitatives de trois types :
 - . Synthèse préférentielle d'immunoglobulines,
 - . Production d'anticorps cytophiles adhérent aux macrophages de la rate,
 - . Induction de l'hypersensibilité retardée, etc...,
 ils correspondent aux adjuvants dits systémiques : adjuvants bactériens.

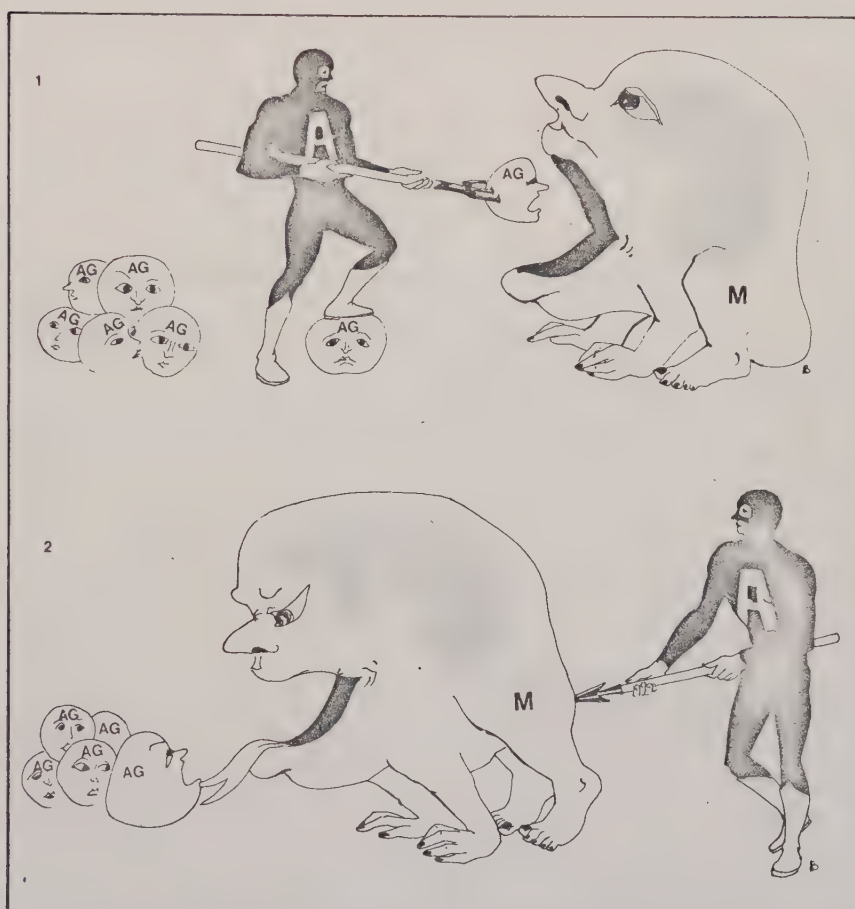
En résumé, les adjuvants locaux exercent leur action sur l'antigène lui-même et les adjuvants systémiques stimulent les cellules immunocompétentes répondant à cet antigène. Une présentation schématique de ces deux catégories d'adjuvants de l'immunité a attiré notre attention (schéma N° 4).

2.3.4. Nature et structure de l'adjuvant utilisé :

L'adjuvant incorporé dans l'une des formules de suppositoires porte le nom de P.A.D. ou "Principe Actif Ducton", fabriqué par les Laboratoires SARBACH.

C'est un lysat glycocollique de la souche S 103 de *Neisseria perflavae*, donc c'est un adjuvant du type II dit systémique bactérien et, si on se réfère à ce qui a été dit sur ce sujet, on peut dire à priori que le

P.A.D. produit une augmentation quantitative de la réponse immune et des modifications d'ordre qualitatif. Au point de vue structure, le P.A.D. est un complexe nucléo-lipo-polysaccharidique.



— Deux conceptions du mécanisme d'action des adjuvants : 1. l'adjuvant « A » assure une meilleure présentation de l'antigène « AG ». — 2. l'adjuvant « A » stimule les cellules — en particulier le macrophage « M » — qui répond à cet antigène.

- Schéma N° 4 -

d'après TOUJAS L. - Cahiers Médicaux Lyonnais,
50, 11, 15.03.1974.-

Troisième Partie

LES MODALITES EXPERIMENTALES

1. - LA FABRICATION DES SUPPOSITOIRES^(*)

1.1. OPERATIONS PRELIMINAIRES -

Le vaccin D.T.T.A.B. que nous avons déjà décrit à la page 27 est présenté dans des boîtes de 20 ampoules de 1 ml. Ce vaccin liquide est introduit dans un récipient approprié, la congélation s'obtient rapidement par un mouvement de rotation dans un bain réfrigérant de -80°C , constitué à parties égales de neige carbonique et d'acétone.

Le récipient contenant le vaccin congelé sous forme d'une fine pellicule est placé sur la rampe de lyophilisation d'un appareil BEDIENUNGSANLEITUNG type L 2.

Le vide est laissé à 0,05 mm de Hg pendant toute l'opération de sublimation. La température de réchauffement étant maintenue entre $28-30^{\circ}\text{C}$, la durée de lyophilisation est de 28 heures, aboutissant à un produit parfaitement pulvérulent : ce qui constitue notre principe actif.

1.2. LA FABRICATION DES SUPPOSITOIRES PROPREMENT DITE -

1.2.1. Formulation :

(Voir tableau N° 5, page suivante)

(*) La fabrication des suppositoires a été faite au Laboratoire de Galénique de l'Institut de Recherche Scientifique des Laboratoires SARBACH à Chatillon-sur-Chalaronne.

- Tableau N° 5 -

	q.s.p. 1 SUPPOSITOIRE	q.s.p. 500 SUPPOSITOIRES
F O R M U L E 1		
Vaccin D.T.T.A.B. lyophilisé (lot 87 -1545 B)	0,005 g	2,5 g
Suppocire AM (lot N° 94)	<u>1,495 g</u> 1,500 g	<u>747,5 g</u> 750,0 g
F O R M U L E 2		
Vaccin D.T.T.A.B. lyophilisé (lot 99-1545 B) (et lot 109-1545 B)	0,005 g	2,5 g
Suppocire AS ₂ X (lot N° 1123)	<u>1,495 g</u> 1,500 g	<u>747,5 g</u> 750,0 g
F O R M U L E 3		
Vaccin D.T.T.A.B. lyophilisé (lot 131-1545 B)	0,005 g	2,5 g
Suppocire BM (lot N° 131)	<u>1,495 g</u> 1,500 g	<u>747,5 g</u> 750,0 g
F O R M U L E 4		
Vaccin D.T.T.A.B. lyophilisé (lot 128-1545 B)	0,005 g	2,5 g
Suppocire BM (lot N° 131)	1,491 g	745,5 g
Principe Actif Ducton N° G-91	<u>0,004 g</u> 1,500 g	<u>2,0 g</u> 750,0 g

La fabrication de ces suppositoires peut se résumer aux opérations suivantes :

- 1) Traitement des substances destinées à être incorporées à l'excipient support.
- 2) Mélange de ces substances avec l'excipient préalablement fondu à la température convenable.

1.2.2. Préparation des substances :

Comme nous l'avons signalé, le vaccin D.T.T.A.B. est à l'état lyophilisé, ainsi que l'adjuvant Principe Actif Ducton de la formule 4. Ces deux substances sont traitées différemment car elles ne possèdent pas les mêmes propriétés physiques de manipulation.

1.2.2.1. Traitement du D.T.T.A.B. lyophilisé :

On doit réduire ce lyophilisat solide à un degré de finesse suffisant pour éviter le risque de sédimentation lors de son incorporation à la masse et faciliter ainsi son absorption par les muqueuses.

Dans ce cas, la réduction de la taille se fait par un simple tamisage : la taille des tamis que nous avons adoptés est de module 21 dont l'ouverture de maille permet d'obtenir une granulométrie moyenne inférieure à 100 microns.

1.2.2.2. Traitement de l'adjuvant Principe Actif Ducton :

Le tamisage de ce produit s'est révélé impossible : sa manipulation est difficile car le Principe Actif Ducton se présente comme un duvet. C'est pour cela que nous avons dû l'incorporer dans la masse à l'aide de broyeur.

1.2.3. Préparation de la masse :

C'est le stade suivant de la fabrication, qui consiste à incorporer intimement le principe actif à l'excipient fondu, c'est ce qui constitue la masse prête à la coulée.

Dans notre cas, le principe actif et l'adjuvant sont insolubles dans l'excipient, donc ils restent en suspension quelle que soit leur granulométrie, comme nous avons pu le voir à l'oeil nu par des essais sur plaque chauffante.

Donc on est en présence d'un système à deux phases et le but est d'incorporer le D.T.T.A.B. et le Principe Actif Ducton dans l'excipient, sans l'aide d'aucun solvant.

1.2.3.1. Incorporation de D.T.T.A.B. lyophilisé :

La fusion de l'excipient est obtenue dans un fondoir thermostaté à la température de 40°C. La répartition homogène du principe actif dans l'excipient fondu est réalisée au moyen d'un agitateur à pales.

1.2.3.2. Incorporation du Principe Actif Ducton :

Elle intéresse uniquement la formule 4. L'incorporation du Principe Actif Ducton dans l'excipient fondu nous a posé un problème d'homogénéisation. En effet, le Principe Actif Ducton se transforme en petits "flocons" de consistance semi-solide, difficilement dispersibles.

On réalise la répartition homogène du Principe Actif Ducton dans l'excipient fondu au moyen d'un turbo-désintégrateur WOLMA. : la masse est entraînée vers la turbine où elle subit un traitement intense de cisaillement et de dispersion.

1.2.3.3. Division de la masse :

La coulée de la masse ainsi obtenue se fait à une température de 40°C environ, dans des moules type "Citrus" qui permettent d'obtenir un démoulage instantané de la totalité des suppositoires. Ces moules sont suremplis, ce suremplissage étant destiné à compenser la rétraction de l'excipient pendant le refroidissement.

Les moules remplis sont introduits dans un réfrigérateur de laboratoire, puis sortis, et après arasement on procède au démoulage. Les suppositoires obtenus sont placés entre deux plaquettes de polyéthylène comportant chacune des marques qui permettent de différencier les quatre formules.

L'encollage a été réalisé sur des encolleuses "Rhodembal Nicolle" du service de fabrication des suppositoires des Laboratoires SARBACH.

Résultat :

Chaque suppositoire comportait donc 5 mg de lyophilisat, c'est-à-dire l'équivalent antigénique de 0,50 ml de vaccin injectable, correspondant à :

- 15 Lf d'anatoxine diphtérique,
- 6,25 Lf d'anatoxine tétanique,
- 212,5 millions de *Salmonella typhi* tués par la chaleur,
- 75 millions de *Salmonella paratyphi* A tués par la chaleur,
- 137,5 millions de *Salmonella paratyphi* B tués par la chaleur.

Nous faisons remarquer que la qualité des principes actifs n'a pas permis leur identification et leur dosage dans le suppositoire terminé.

2. - LE PROTOCOLE EXPERIMENTAL DE L'IMMUNISATION

2.1. CHRONOLOGIE DES ESSAIS D'IMMUNISATION -

Pour comparer la valeur immunisante de nos quatre préparations, il a été opéré comme suit :

- 4 lots expérimentaux de 10 lapins ayant un poids moyen de 3,150 kg.

- . Le 1^{er} lot est traité par la préparation de la formule 1.
- . Le 2^{ème} lot est traité par la préparation de la formule 2.
- . Le 3^{ème} lot est traité par la préparation de la formule 3.
- . Le 4^{ème} lot est traité par la préparation de la formule 4.

Le protocole expérimental s'étend sur 110 jours avec l'application journalière d'un suppositoire de la formule correspondante pendant 30 jours consécutifs : * (voir tableaux des taux d'anticorps).

2.2. LES MODALITES D'APPLICATION DU SUPPOSITOIRE -

Le suppositoire est introduit dans le rectum des lapins à l'aide de l'index préalablement muni de gant et maintenu pendant quelques minutes pour éviter son expulsion par l'animal.

2.3. LES MODALITES DES PRELEVEMENTS DE SANG -

Toutes les prises de sang ont été pratiquées dans la veine marginale de l'oreille du lapin non anesthésié, et ceci après désinfection locale avec l'alcool. On plante une aiguille stérile dans la veine marginale de l'oreille et le prélèvement est fait par écoulement direct dans un tube plastique stérile.

On laisse les prélèvements deux heures à la température du laboratoire. On décolle le caillot à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée. On place le tube à 4°C pendant 18 heures environ.

Le sérum est alors décanté et centrifugé, puis stocké à -18°C et, au moment des analyses, les divers prélèvements sont rapidement décongelés.

3. - METHODES DE CONTROLE DE L'IMMUNISATION

3.1. TITRAGE DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES PAR HEMAGGLUTINATION PASSIVE -

Nous avons la possibilité d'utiliser soit des méthodes de neutralisation (neutralisation du pouvoir dermo-nécrotique - neutralisation du pouvoir cytotoxique de la toxine), soit une méthode d'hémagglutination passive. Celle-ci se prête particulièrement bien à des déterminations en série sur des petites quantités de sérum - CABAU et LEVY, 1968 (11) - mais une concordance constante entre les résultats donnés par les deux types de méthodes n'est pas admise par tous.

Cependant, nous référant aux études comparatives de LANDY et coll., 1954 (56), et récemment aux conclusions de A. CORNET, 1968 (21), qui avait noté une bonne corrélation dans un essai d'immunisation trachéo-bronchique chez l'animal, c'est la méthode d'hémagglutination passive que nous avons utilisée dans une méthodologie mise au point par l'Institut du Massachussetts^(*).

3.1.1. Principe :

Des hématies de cheval, tannées, puis sensibilisées par la toxine diphtérique selon la technique de BOYDEN, sont agglutinées par les anticorps correspondants.

(*) Biologic Laboratories, Institute of Laboratories. Massachussetts, Department of Public Health, Nov., 25, 1964, "Assay of diphtheria and tetanus antitoxin by the hemagglutination method".

3.1.2. Réactifs :

3.1.2.1. Solutions tampons :

On prépare :

- Solution de phosphate disodique 0,15 M
($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) à 53,73 g par litre,
- Solution de phosphate monopotassique à 0,15 M
(KH_2PO_4) à 20,41 g par litre,

afin d'obtenir les solutions tampons de pH 7,2 et 6,4.

Solution tampon pH 7,2 :

- Solution phosphate disodique 0,15 M..... 380 ml
- Solution phosphate monopotassique 0,15 M.. 119 ml
- Solution de chlorure de sodium 9 g/l q.s.p. 1000 ml

Solution tampon pH 6,4 :

- Solution phosphate disodique 0,15 M..... 161 ml
- Solution phosphate monopotassique 0,15 M.. 338 ml
- Solution de chlorure de sodium 9 g/l q.s.p. 1000 ml

3.1.2.2. Le sérum normal de lapin (S.N.L.)^(*) :

Ce sérum obtenu par ponction cardiaque d'un lapin en bonne santé est décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes. Il faut signaler que tous les lapins ne fournissent pas un sérum convenable. Avec chaque nouveau S.N.L., on recommencera donc le titrage d'un sérum antidiphthérique standard. On conservera uniquement les S.N.L. qui donnent une agglutination franche au fond des tubes et avec lesquels la dernière dilution hémagglutinante de sérum standard pourra être facilement déterminée. Cette dilution devra correspondre au titre du sérum.

3.1.2.3. Solution d'acide tannique :

Solution mère d'acide tannique à 1 g pour 100 ml :

Cette solution, préparée avec du sérum physiologique, peut être conservée au réfrigérateur.

(*) S.N.L. : sérum normal de lapin, désigné dans les pays anglo-saxons sous le sigle N.R.S. (normal rabbit serum).

Solution diluée d'acide tannique à 1/25.000 :

Elle est obtenue par dilution extemporanée de la solution mère dans le sérum physiologique.

3.1.2.4. Sensibilisation des hématies de cheval :

Lavage des hématies :

- On centrifuge à 2.000 t/minute environ 3 ml de sang défibriné de cheval.
- On place 1 ml de culot globulaire dans un tube à centrifuger conique de 20 ml.
- On complète le volume à 15 ml avec du sérum physiologique, puis on homogénéise soigneusement avant de centrifuger à 2.000 t/minute pendant 5 minutes, on rejette le surnageant.
- On recommence deux fois cette opération de lavage.
- Le dernier culot globulaire est dilué avec 40 ml de tampon isotonique pH 7,2, on obtient ainsi une suspension à 2,5 p. 100 du culot.

Tannage des hématies :

- On mélange 20 ml de suspension globulaire avec 20 ml de solution d'acide tannique à 1/25.000.
- Le mélange est laissé 10 minutes à la température du laboratoire.
- On centrifuge à 1.500 tours par minute pendant 10 minutes.
- On lave ensuite deux fois les hématies dans le tampon 7,2.
- On complète le volume à 20 ml avec du sérum physiologique.

- Une partie de la suspension est conservée, elle servira ultérieurement de "témoin hématies tannées" au cours de la réaction.

Sensibilisation des hématies tannées :

- A 15 ml de suspension d'hématies tannées on ajoute 60 ml de toxine diphtérique dont le titre est ramené à 37,5 Lf/ml à l'aide du tampon pH 6,4. Le mélange a alors un titre de 30 Lf/ml.
- On laisse le mélange 10 minutes à la température du laboratoire.
- On centrifuge ensuite ce mélange 10 minutes à 1.500 t/minute. On lave une fois le culot globulaire avec une dilution à 1/250 de S.L.N. dans le sérum physiologique.
- On remet ensuite les hématies en suspension dans le S.L.N. dilué au 1/250^e.

3.1.3. Réaction :

3.1.3.1. Dilution des sérums :

Sérum étalon de Copenhague^(*) :

Ce sérum contient 10 unités/ml. Son titre est ramené à 1 μ /ml par dilution dans le sérum physiologique. Cette solution est de nouveau diluée dans un rapport d'ordre 2 (sous un volume de 0,5 ml) jusqu'à atteindre 1/4096^e.

Sérums à étudier :

Les sérums à étudier sont également dilués dans un rapport d'ordre 2 dans le S.N.L. à 1 % sous un volume de 0,5 ml jusqu'à 1/4096^e.

(*) Statens Serum Institute, Artillerivej 80, Copenhague S (Danemark).

3.1.3.2. Réaction :

Deux galeries sont effectuées, l'une avec du sérum étalon, l'autre avec le sérum à étudier, d'après le tableau ci-après.

Les galeries de tubes sont agitées vigoureusement afin d'obtenir une dispersion parfaite des hématies. On laisse reposer deux heures avant de lire la réaction.

N° tubes...	1	2	3	4	5 à 11	12	Témoin G.R. sensibili- sés	Témoin G.R. tannés
Dilution du sérum...	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32 à 1/2060	1/409		
Sérum.....	0,5	0	0	0	0	0	0	0
S.L.N.	0,5 ↘ 0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5 ↗ rejet	0,5	0,5
G.R. sensibilisés	1	1	1	1	1	1	1	0
G.R. tannés....	0	0	0	0	0	0	0	1

3.1.3.3. Lecture de la réaction :

Le fond des tubes est examiné au moyen d'un miroir concave. Une réaction négative se traduit par la présence d'une couronne d'hématies rassemblées régulièrement au fond du tube. En revanche, une réaction positive montre des hématies hémagglutinées sur tout le fond du tube.

3.1.3.4. Calcul du titre :

Si, par exemple, le dernier tube pour lequel on obtient une hémagglutination positive avec le sérum étalon contient une dilution à $1/256$ et que la plus forte dilution hémagglutinante du sérum à tester est de $1/64$, ce sérum possède un titre quatre fois plus faible que le sérum étalon. Il contient donc 0,25 unités/ml.

3.2. TITRAGE DES ANTICORPS ANTITÉTANIQUES -

La technique de dosage des anticorps antitétaniques par neutralisation du pouvoir léthal sur la souris est un test complexe posant des problèmes pratiques importants.

Nous avons utilisé un test d'agglutination passive sur particule de latex décrit par F. HERZOG et coll. en 1972 (46). Une comparaison de cette réaction avec le test de protection sur la souris a permis d'établir la sensibilité du test au latex qui peut révéler un taux = 0,02 UI/ml et une bonne corrélation entre les deux méthodes pour les taux faibles et moyens d'anticorps qui permet de convertir le titre agglutinant en unités internationales / ml.

3.2.1. Principe de la réaction :

Cette réaction est basée sur l'agglutination des particules de latex recouvertes d'anatoxine tétanique, par les anticorps antitétaniques du sujet. Elle consiste à mélanger un volume égal de dilutions progressives de sérum dans du sérum physiologique (pH = 7,2) avec une suspension de latex sensibilisée et diluée au $1/10^e$.

3.2.2. Technique du test :

3.2.2.1. Antigène utilisé :

L'anatoxine tétanique utilisée^(*) est une anatoxine partiellement purifiée P 50, présentant une activité spécifique voisine de 1.500 Lf/mgN et titrant 1.000 Lf/ml.

3.2.2.2. Sensibilisation du latex :

Les particules de latex utilisées (Bacto-Latex Difco 0,81) sont sensibilisées par une incubation de 60 minutes dans un bain-marie à 37°C avec un volume égal d'anatoxine tétanique à 1.000 Lf/ml.

Le précipité obtenu après une centrifugation de 20 minutes à 2.000 g est lavé trois fois dans du sérum physiologique (pH = 7,2) (afin d'éliminer l'anatoxine non liée), et les particules de latex recouvertes d'anatoxine reprises dans cinq fois leur volume initial, constituent la suspension mère d'antigène qui est stable trois semaines au réfrigérateur à +4°C : elle est diluée au 1/10^e dans le sérum physiologique tamponné au moment de son utilisation qui, pour avoir lieu dans les conditions optima, doit intervenir après un séjour de 48 heures au réfrigérateur.

3.2.2.3. Test au latex :

Une incubation de 30 minutes à 56°C de 0,5 ml de sérum à titrer et de 0,5 ml de suspension de latex - non traité - permet simultanément de décomplémenter les sérums et d'adsorber les facteurs agglutinants non spécifiques.

(*) Elle est préparée spécialement à l'Institut Pasteur de Garches (Docteurs B. BIZZINI et A. TURPIN).

Les particules de latex sont éliminées à l'aide de deux filtrations successives sur membrane millipore (0,45 et 0,22 μ) et le sérum obtenu - dilué au 1/2 - est totalement dépourvu d'agglomérats de latex.

Puis on prépare des dilutions successives de sérum (0,1 ml) dans du sérum physiologique tamponné, dans des plaques en matière plastique à godets^(*), de 1/4 à 1/8192. Dans chaque test sont inclus trois contrôles : deux sérums de références (l'un immun de titre connu, l'autre négatif) et un témoin antigène.

Une quantité de 0,1 ml de la suspension d'antigène diluée au 1/10^e est ajoutée à chaque dilution sérique.

Après incubation de deux heures à l'étuve à 37°C, les plaques couvertes sont laissées vingt-quatre heures à la température du laboratoire, à l'abri d'une source de chaleur.

3.2.2.4. Lecture de la réaction :

La lecture se fait le lendemain à l'aide d'une loupe, sur un fond noir, et la différenciation des sérums négatifs des agglutinations positives est extrêmement nette et aisée, de même que l'appréciation de la limite de l'agglutination :

Résultats positifs :

Les particules de latex agglutinées se présentent sous la forme de gros agrégats flottant dans un liquide clair, fréquemment répartis à la périphérie du godet, prenant l'aspect d'un anneau.

Résultats négatifs :

Les particules de latex se trouvent rassemblées dans le fond du godet où elles sont agglomérées sous la forme d'un point blanc à contour circulaire, le liquide surnageant présentant un aspect trouble laiteux.

(*) Plaques en matière plastique à godets à fond rond (volumes des cupules : 0,3 ml) Limbro SC 96. Trempage de 12 heures dans de l'eau distillée et séchage une nuit à l'étuve à 37°C, le fond de la plaque dirigé vers le haut.

Titre du sérum :

Le titre du sérum est le taux de la dernière dilution qui présente une agglutination nette et un surnageant limpide.

3.3. TITRAGE DES ANTICORPS ANTI-SALMONELLA TYPHIQUES ET PARATYPHIQUES A ET B -

La réaction utilisée est celle connue sous le nom de séro-diagnostic qualitatif de Widal-Félix. C'est une réaction d'agglutination qui met en évidence dans les sérums les agglutinines O correspondant aux antigènes somatiques et les agglutinines H correspondant aux antigènes flagellaires.

3.3.1. Principe :

La réaction est basée sur l'agglutination de suspensions alcoolisées spécifiques O et de suspensions formolées spécifiques H de chaque type bactérien, par les agglutinines présentes dans le sérum du sujet.

3.3.2. Technique :

Elle comporte deux temps :

- Une technique rapide par centrifugation exécutée sur deux dilutions du sérum 1/100 et 1/200 permet un screening. On réalise la galerie suivante et on fait une lecture immédiate.

N° tubes..	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Sérum 1/20	0,1			0,1			0,1			0,1			0,1			0,1		
Sérum 1/10	0,1			0,1			0,1			0,1			0,1			0,1		
0,9 Ag dans chaque tube	TO			TH			AO			AH			BO			BH		
Dilution finale	1/100 1/200 ^T			1/100 1/200 ^T														

- Une technique lente avec séjour de deux heures à l'étuve à 37°C et lecture 18 heures après. Elle est exécutée sur les sérums trouvés précédemment positifs, en utilisant des dilutions authentiques allant du 1/100 au 1/3200. On réalise trois fois la galerie suivante (antigène S. typhi - paratyphi A et paratyphi B).

N° tubes..	1	2	3	4	5	6	T	7	8	9	10	11	12	T
Sérum dilué	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1		0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	
Ag O.....	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9							
Ag H.....								0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Eau physiologique							0,1							0,1
Dilution finale	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200		1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	

- Deuxième galerie -

3.3.3. Lecture :

La lecture est faite en s'aidant d'un miroir concave après remise en suspension par une chiquenaude.

L'agglutination O est fine et granulaire. L'agglutination H est floconneuse.

Les résultats sont exprimés par l'inverse de la dernière dilution agglutinante.

Quatrième Partie

LES RESULTATS EXPERIMENTAUX

1. - TABLEAUX DES TAUX D'ANTICORPS

Les taux d'anticorps apparus chez chacun des lapins des 4 lots au cours de l'expérimentation figurent dans les tableaux N° 6 à 45.

Les taux moyens des anticorps obtenus avec chaque lot de lapins sont rassemblés dans les tableaux 46 à 49.

Les taux d'anticorps antidiphtériques et antitétaniques sont exprimés en unité internationale par millilitre : UI/ml. Pour les anticorps anti-Salmonella typhi et paratyphi A et B, les résultats sont exprimés par l'inverse de la dernière dilution agglutinante. (les résultats de la formule 1 avaient été obtenus dans une expérimentation récente faite dans le Service d'Immunologie de l'Institut Pasteur de Lyon).

2. - LES COURBES D'IMMUNISATION

La courbe d'immunisation de chaque lapin apparaît dans les graphes N° 1 à 40, et afin de mieux apprécier la qualité des résultats en fonction des excipients nous avons réuni sur les graphes N° 41 à 45 les courbes moyennes des taux d'anticorps concernant les animaux de chaque lot et correspondant à chacun des excipients.

- Tableau N° 6 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIKES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule I : AM - Lapin N° 721 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,5	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,5	0	0	0	0	0	0
40		0,007	0,5	0	0	0	0	0	0
45		0,007	0,2	0	0	0	0	0	0
50		0,007	0,5	0	0	0	0	100	0
60		0,015	0,5	400	400	0	0	200	0
70		0,015	0,02	0	100	0	100	0	200
75		0,007	0,02	0	100	0	200	0	200
80		0,031	0,02	0	400	0	200	0	100
85		0,031	0,02	0	400	0	100	0	100
90		0,007	0,02	0	200	0	100	0	0
95		0,007	<0,02	0	200	0	100	0	100
100		0,007	0,1	0	100	0	200	200	100
110		0	0,04	0	0	0	100	100	0

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule I : AM - Lapin N° 722 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0,50	0,5	200	100	0	0	0	0
40		0,50	5	200	100	0	0	100	0
45		ND	1	800	100	0	0	200	0
50		0,25	1	200	200	0	0	200	0
60		0,25	0,5	400	200	0	0	200	0
70		0,03	0,02	200	0	0	0	200	0
75		ND	0,04	400	100	0	0	400	100
80		ND	0,1	400	100	0	0	400	100
85		2	0,2	400	200	0	200	400	200
90		0,126	0,04	200	100	0	100	200	200
95		0,25	0,04	200	0	0	0	200	100
100		0,01	0,1	200	0	0	0	200	100
110		0,064	0,2	200	0	0	0	200	0

- Tableau N° 8 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule I : AM - Lapin N° 723 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0,25	0,2	100	100	0	100	100	0
40		1	1	0	100	100	100	0	0
45		0,5	5	0	100	100	100	100	100
50		1	0,50	0	0	0	0	0	0
60		0,50	0,50	0	100	0	0	200	0
70		0,50	0,02	100	0	0	0	100	100
75		ND	0,04	100	100	0	100	100	100
80		1	0,14	100	100	0	100	100	100
85		0,50	0,14	100	0	0	0	100	0
90		ND	0,10	0	0	0	0	0	0
95		0,06	0,04	0	0	0	0	0	0
100		ND	0,10	0	0	0	0	0	0
110		0	0,20	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 9 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule I : AM - Lapin N° 724 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,10	0	0	0	0	0	0
30	*	0,25	0,50	100	200	100	0	100	0
40		0,125	1	100	200	100	0	100	0
45		0,25	0,50	0	400	0	0	200	0
50		0,062	0,50	0	200	0	0	0	0
60		0,015	0,20	0	100	0	0	0	0
70		0,015	0,02	100	0	0	0	100	0
75		0,062	0,04	100	0	0	0	100	0
80		0,062	0,04	100	0	0	0	100	0
85		0,062	0,04	200	100	0	0	100	0
90		0,031	0,04	100	0	0	0	0	0
95		0,031	0,04	0	0	0	0	0	0
100		0,007	0,04	0	0	0	0	0	0
110		0,007	0,02	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 10 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule I : AM - Lapin N° 725 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	ND	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	ND	0,5	100	100	0	0	100	0
40		0	1	100	200	100	0	100	0
45		0	5	0	100	0	0	100	0
50		0	1	200	400	0	0	200	0
60		0,015	0,5	0	100	0	0	100	0
70		0,125	<0,02	0	0	0	0	0	0
75		0,250	0,02	0	0	0	0	0	0
80		0,50	0,02	0	0	0	0	0	0
85		0,062	0,04	0	0	0	0	0	0
90		0,015	0,04	0	0	0	0	0	0
95		0	0,04	0	0	0	0	0	0
100		0	0,04	0	0	0	0	0	0
110		0,062	0,20	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 11 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule I : AM - Lapin N° 731 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	100	400	0	0	0	0
30	*	ND	0,50	200	1600	100	0	200	0
40		0,062	1	100	1600	0	0	200	0
45		0,125	1	100	1600	0	0	200	0
50		0,062	1	200	800	0	0	200	0
60		0	0,20	0	0	0	0	0	0
70		0,062	<0,02	0	0	0	0	200	0
75		0,062	<0,02	0	0	0	0	400	0
80		ND	0,04	0	0	0	0	400	0
85		0,031	0,04	100	0	100	0	400	0
90		0,031	0,04	100	0	100	0	400	0
95		0,031	0,04	100	0	100	0	100	0
100		0,062	0,10	100	0	0	0	100	0
110		0,062	0,20	100	0	0	0	200	0

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule I : AM - Lapin N° 732 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,1	100	0	100	0	0	0
40		0,015	0,50	0	0	0	0	0	0
45		0,031	0,50	0	0	0	0	0	0
50		0,031	0,50	0	0	0	0	0	0
60		0,015	0,20	0	0	0	0	0	0
70		0	0,02	0	0	0	0	0	0
75		0	0,02	0	0	0	0	0	0
80		mort							
85		mort							
90		mort							
95		mort							
100		mort							
110		mort							

- Tableau N° 13 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule I : AM - Lapin N° 733 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,10	0	0	0	0	0	0
30	*	ND	0,20	100	0	100	0	0	0
40		0,062	1	0	0	0	0	0	0
45		ND	1	0	0	0	0	0	0
50		0,015	0,50	0	0	0	0	0	0
60		0,031	0,20	0	0	0	0	0	0
70		0	0,02	0	0	0	0	0	0
75		0,015	<0,02	0	0	0	0	0	0
80		0,015	0,02	0	0	0	0	0	0
85		0,015	0,04	0	0	0	0	0	0
90		0	0,04	0	0	0	0	0	0
95		0,015	0,04	0	0	0	0	0	0
100		0,062	0,10	0	0	0	0	0	0
110		0,50	0,20	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 14 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule I : AM - Lapin N° 734 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
30	*	ND	0,20	200	100	100	0	0	100
40		0,062	5	100	100	0	0	0	100
45		0,25	5	0	100	0	0	0	200
50		0,07	1	0	0	0	0	0	0
60		0,062	0,20	0	0	0	0	0	0
70		1	0,20	0	0	0	0	0	200
75		1	0,50	0	0	0	0	0	200
80		0,25	0,20	0	0	0	0	0	200
85		1	0,10	0	0	0	0	0	200
90		1	0,10	0	0	0	0	100	200
95		1	0,20	0	0	0	0	200	200
100		0,031	0,10	0	0	0	0	100	200
110		0,031	0,20	0	0	0	0	100	200

- Tableau N° 15 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule I : AM - Lapin N° 735 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,10	0	100	0	0	0	0
30	*	0	0,10	100	200	0	0	0	100
40		0,125	0,20	0	100	100	100	100	100
45		0,062	0,50	0	0	0	0	100	0
50		0,031	0,50	0	400	0	0	0	0
60		0,015	0,20	0	0	0	0	0	0
70		0,031	0,02	0	0	0	0	0	0
75		0,015	<0,02	0	0	0	0	0	0
80		0,062	0,04	0	0	0	0	0	0
85		0,031	0,02	0	0	0	0	0	0
90		0,062	0,04	0	0	0	0	0	0
95		0,031	0,04	0	0	0	0	0	0
100		0,062	0,10	0	0	0	0	0	0
110		0,015	0,10	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 16 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule II : AS₂X - Lapin N° 243 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0,01	0	0	0	0	0	0	0
15	*	0,01	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0
40		0,12	0,02	0	0	0	0	0	0
50		0,0035	0,2	0	0	0	0	0	0
70		0,01	0,1	0	0	0	0	0	0
85		1	0,1	0	0	0	0	0	0
100		0,5	0,1	0	0	0	0	0	0
110		0,5	0,1	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 17 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule II : AS₂X - Lapin N° 244 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,2	0	0	0	0	0	0
40		0	0,04	0	0	0	0	0	0
50		0	0,04	0	0	0	0	0	0
70		0	0,1	0	0	0	0	0	0
85		0	0,1	0	0	0	0	0	0
100		0	0,1	0	0	0	0	0	0
110		0	0,1	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 18 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule II : AS₂X - Lapin N° 245 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
30	*	0,0156	0,1	0	0	0	0	0	0
40		0,0078	0,04	0	0	0	0	0	0
50		0,0078	0,02	0	0	0	0	0	0
70		0,0078	0,1	0	0	0	0	0	0
85		0,0078	0,1	0	0	0	0	0	0
100		0,5	0,1	0	0	0	0	0	0
110		0,0078	0	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 19 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule II : AS₂X - Lapin N° 246 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,2	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
40		0	0,1	0	0	0	0	0	0
50		0	0	0	0	0	0	0	0
70		0	0	0	0	0	0	0	0
85		0	0	0	0	0	0	0	0
100		0	0,1	0	0	0	0	0	0
110		0	0,1	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 20 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule II : AS₂X - Lapin N° 247 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0,01	0	0	0	0	0	0	0
15	° *	0,01	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0,25	5	0	0	0	0	0	0
40		0,01	0,5	0	0	0	0	0	0
50		0,01	0,04	0	0	0	0	0	0
70		0,01	0,1	0	0	0	0	0	0
85		0,01	0,02	0	0	0	0	0	0
100		0,01	0,02	0	0	0	0	0	0
110		0,01	0,02	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 21 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule II : AS₂X - Lapin N° 248 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,5	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,5	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,25	0	0	0	0	0	0
40		0	0,25	0	0	0	0	0	0
50		0	0,02	0	0	0	0	0	0
70		0	0,1	0	0	0	0	0	0
85		0	0,02	0	0	0	0	0	0
100		0	0,04	0	0	0	0	0	0
110		0	0,04	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 22 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule II : AS₂X - Lapin N° 249 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
40		0	0,04	0	0	0	0	0	0
50		0	0,04	0	0	0	0	0	0
70		0	0,1	0	0	0	0	0	0
85		0	0,1	0	0	0	0	0	0
100		0	0,02	0	0	0	0	0	0
110		0	0,04	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 23 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule II : AS₂X - Lapin N° 250 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,2	0	0	0	0	0	0
40		0	0,5	0	0	0	0	0	0
50		0	0,1	0	0	0	0	0	0
70		0	0,1	0	0	0	0	0	0
85		0	0,04	0	0	0	0	0	0
100		0	0,04	0	0	0	0	0	0
110		0	0,04	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 24 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule II : AS₂X - Lapin N° 251 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
40		0	0,04	0	0	0	0	0	0
50		0	0,1	0	0	0	0	0	0
70		0	0,02	0	0	0	0	0	0
85		0	0,04	0	0	0	0	0	0
100		0	0,02	0	0	0	0	0	0
110		0	0,02	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 25 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule II : AS₂X - Lapin N° 252 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,5	0	0	0	0	0	0
40		0	0,2	0	0	0	0	0	0
50		0	0,2	0	0	0	0	0	0
70		0	0,2	0	0	0	0	0	0
85		0	0,04	0	0	0	0	0	0
100		0,0312	0,02	0	0	0	0	0	0
110		0,0156	0,1	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 26 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule III : BM - Lapin N° 761 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,25	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,25	0	0	0	0	100	0
40		0,007	0,25	100	100	0	0	0	0
50		0,007	0,5	100	0	0	0	200	0
55		0,007	0,5	100	100	0	0	200	0
60		1	0,25	100	100	0	100	200	0
80		1	0,04	400	100	100	100	200	0
90		0	0,04	400	100	200	200	200	0
95		0	0	100	0	0	0	100	0
100		0	0	100	0	0	0	0	0
110		0	0	100	0	0	0	0	0

- Tableau N° 27 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule III : BM - Lapin N° 762 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,25	100	200	0	0	100	0
40		0	0,25	100	100	0	0	0	0
50		0	0,25	400	200	200	100	100	0
55		0,031	0,5	400	0	0	100	0	0
60		0,015	0,5	100	0	0	100	0	0
80		1	0,25	100	0	0	0	0	0
90		1	0,25	100	100	100	0	0	0
95		0	0	100	0	0	0	0	0
100		0	0	100	0	0	0	0	0
110		0	0	100	0	0	0	0	0

- Tableau N° 28 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule III : BM - Lapin N° 763 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,2	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,2	100	0	0	0	100	0
40		0	0,5	100	0	0	0	100	0
50		0,125	0,5	100	0	100	0	100	0
55		0,125	0,04	0	0	0	0	200	0
60		0,125	0,2	0	0	0	0	100	0
80		1	0,5	0	0	0	0	200	0
90		1	0,5	0	100	0	0	200	0
95		0	0,1	0	0	0	0	0	0
100		0	0,04	0	0	0	0	0	0
110		0	1	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 29 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule III : BM - Lapin N° 764 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,04	0	0	0	100	0	0
30	*	0	0,25	100	100	0	100	100	0
40		0	0,25	200	100	0	100	0	100
50		mort							
55		mort							
60		mort							
80		mort							
90		mort							
95		mort							
100		mort							
110		mort							

- Tableau N° 30 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule III : BM - Lapin N° 765 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,1	100	0	0	100	0	0
40		0	0,1	100	100	0	100	0	100
50		0,031	0,5	200	100	100	100	100	100
55		0,031	0,5	200	0	100	100	0	0
60		0,015	0,5	200	0	0	0	0	0
80		1	0,5	400	0	100	0	200	0
90		1	0,5	400	0	100	0	200	100
95		0	0,25	200	0	0	0	0	0
100		0	0,25	0	0	0	0	0	0
110		0	0	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 31 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule III : BM - Lapin N° 766 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,1	100	0	0	0	100	0
40		1	0,1	100	0	100	0	200	0
50		1	0,5	100	100	100	0	200	0
55		0,5	0,5	200	200	0	0	200	0
60		0,5	0,5	200	200	0	0	100	0
80		1	0,5	800	200	0	0	100	0
90		1	0,5	800	200	0	0	0	0
95		0	0,25	0	0	0	0	0	0
100		0	0,25	0	100	0	0	0	0
110		0	0,25	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 32 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formulé III : BM - Lapin N° 767 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,02	200	100	0	0	0	0
40		0	0,5	200	100	0	0	0	0
50		0,003	0,5	200	100	0	0	0	0
55		0,003	0,5	200	100	0	0	0	0
60		0,003	0,5	200	200	0	0	0	0
80		1	0,5	400	200	100	0	100	0
90		1	0,5	400	400	100	0	100	200
95		0	0,25	400	100	0	0	200	0
100		0	0,25	200	0	0	0	0	0
110		0	0,25	200	0	0	0	0	0

- Tableau N° 33 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule III : BM - Lapin N° 768 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,02	0	100	0	0	0	0
40		0	0,25	100	0	0	0	0	0
50		0,25	0,25	100	0	100	0	100	0
55		0,25	0,25	0	0	0	0	100	100
60		0,25	0,25	0	100	0	0	100	0
80		1	0,25	100	0	0	0	0	100
90		1	0,25	100	0	0	0	0	100
95		0	0	100	0	0	0	0	0
100		0	0	0	0	0	0	0	0
110		0	0	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 34 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule III : BM - Lapin N° 769 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,1	100	0	0	0	0	0
40		0	0,25	100	0	0	0	0	0
50		0,007	0,5	200	100	0	200	100	0
55		0,007	0,5	400	100	0	100	0	0
60		0,062	0,5	200	100	0	100	0	0
80		1	0,25	800	200	100	100	200	0
90		1	0,02	800	200	100	200	200	0
95		0	0,04	400	100	0	200	100	0
100		0	0,04	400	0	0	100	0	0
110		0	0,04	200	0	0	0	0	0

- Tableau N° 35 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule III : BM - Lapin N° 770 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,04	100	0	0	0	0	0
40		0	0,04	100	100	0	100	100	0
50		0	0,04	100	100	0	0	100	0
55		mort							
60		mort							
80		mort							
90		mort							
95		mort							
100		mort							
110		mort							

- Tableau N° 36 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 1 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,04	0	0	0	0	100	0
30	*	0	0,5	100	0	0	0	0	0
40		0	0,25	200	0	0	0	0	0
50		0,015	0,25	200	0	0	0	100	0
55		0,015	0,04	200	100	0	0	100	0
60		0,015	0,04	200	100	0	0	100	0
80		1	0,04	400	100	100	0	200	200
90		1	0,04	200	100	100	0	200	100
95		0	0,04	100	100	0	0	100	0
100		0	0,04	100	0	0	0	100	0
110		0	0,04	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 37 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 2 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,1	0	0	0	0	100	0
40		0	0,25	0	0	0	0	100	0
50		0,015	0,04	100	0	0	0	100	0
55		0,007	0,04	200	0	0	0	100	0
60		0,007	0,04	200	0	100	0	100	0
80		1	0,04	200	0	100	0	200	100
90		1	0,04	200	0	100	0	200	100
95		0	0,04	100	0	0	0	100	0
100		0	0,02	0	0	0	0	0	0
110		0	0,02	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 38 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 3 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,25	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,1	200	0	0	0	100	0
40		0,015	0,25	200	100	0	0	100	0
50		0,015	0,25	200	100	0	0	0	0
55		0,015	0,25	200	100	0	0	0	0
60		0,015	0,25	200	100	0	0	0	0
80		1	0,25	800	200	0	100	200	100
90		mort							
95		mort							
100		mort							
110		mort							

- Tableau N° 39 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIKES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 4 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
30	*	mort							
40		mort							
50		mort							
55		mort							
60		mort							
80		mort							
90		mort							
95		mort							
100		mort							
110		mort							

- Tableau N° 40 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 5 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,5	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0	1	200	100	0	0	0	0
40		0	1	100	100	0	0	100	0
50		0	0,5	100	100	100	0	0	0
55		0,25	0,2	100	200	100	0	100	0
60		0,25	0,1	100	100	0	200	100	0
80		1	0,2	400	200	0	0	200	0
90		1	0,04	400	200	200	0	200	100
95		0	0,5	100	100	0	0	100	0
100		0	0,2	100	0	0	0	0	0
110		0	0,5	100	0	0	0	0	0

- Tableau N° 41 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 6 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,04	0	0	0	0	0	0
30	*	0,125	0,25	100	100	0	0	100	0
40		0,007	0,25	100	0	0	0	0	0
50		0,007	0,25	200	100	0	0	100	100
55		0	0,25	200	100	0	0	200	0
60		0	0,25	200	100	0	0	200	0
80		mort							
90		mort							
95		mort							
100		mort							
110		mort							

- Tableau N° 42 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 7 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,02	100	0	0	0	0	0
30	*	0	0,25	100	0	0	0	100	0
40		0	0,25	100	0	0	0	100	0
50		0,5	0,25	0	0	0	0	100	0
55		0,5	0,25	0	0	0	0	0	0
60		0,5	0,25	0	0	100	0	0	0
80		1	0,50	400	0	100	0	200	0
90		1	0,50	400	100	100	0	200	400
95		0	0,02	200	100	100	0	200	0
100		0	0,02	100	100	100	0	0	0
110		0	0	0	0	100	0	0	0

- Tableau N° 43 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 8 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
40		0,007	0,25	0	0	0	0	100	0
50		0,007	0,25	200	0	0	0	100	0
55		0,007	0,25	200	100	0	0	0	0
60		0,007	0,25	200	100	0	0	0	0
80		1	0,25	400	100	200	100	200	0
90		1	0,25	400	100	0	100	200	0
95		mort							
100		mort							
110		mort							

- Tableau N° 44 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIKES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 9 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,02	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,25	200	100	200	0	100	0
40		mort							
50		mort							
55		mort							
60		mort							
80		mort							
90		mort							
95		mort							
100		mort							
110		mort							

- Tableau N° 45 -

TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 10 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,1	0	0	0	0	0	0
30	*	0	0,25	0	0	0	0	0	0
40		0,125	0,25	0	0	0	0	0	0
50		0,125	0,25	100	0	0	0	0	0
55		0,062	0,5	100	0	0	0	0	0
60		0,062	0,5	100	0	0	0	100	0
80		1	0,25	200	0	0	0	200	0
90		1	0,25	200	0	0	100	200	200
95		0	0,25	200	0	0	100	200	200
100		0	0	200	0	0	100	200	0
110		0	0	200	0	0	0	100	0

- Tableau N° 46 -

MOYENNES DES TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule I : AM - Lapins N° 721 à 725 et 731 à 735 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,12	10	50	0	0	0	0
30	*	0,20	0,33	120	240	50	10	50	20
40	*	0,19	1,62	60	240	40	20	60	20
45		0,15	1,97	90	240	10	10	90	30
50		0,15	0,70	60	200	0	0	60	0
60		0,09	0,32	80	90	0	0	70	0
70		0,17	0,03	40	10	0	10	60	50
75		0,17	0,07	60	30	0	30	100	60
80		0,27	0,06	111	61	0	33	111	55
85		0,41	0,07	133	178	11	33	111	55
90		0,15	0,05	44	33	11	22	87	44
95		0,15	0,05	33	22	11	11	70	20
100		0,03	0,08	33	11	0	22	66	44
110		0,08	0,19	33	0	0	11	66	22

- Tableau N° 47 -

MOYENNES DES TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule II : AS₂X - Lapins N° 243 à 252 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0,002	0,084	0	0	0	0	0	0
15	*	0,002	0,130	0	0	0	0	0	0
30	*	0,076	0,68	0	0	0	0	0	0
40		0,013	0,160	0	0	0	0	0	0
50		0,002	0,076	0	0	0	0	0	0
70		0,002	0,092	0	0	0	0	0	0
85		0,10	0,05	0	0	0	0	0	0
100		0,10	0,04	0	0	0	0	0	0
110		0,05	0,04	0	0	0	0	0	0

- Tableau N° 48 -

MOYENNES DES TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule III : BM - Lapins N° 761 à 770 -

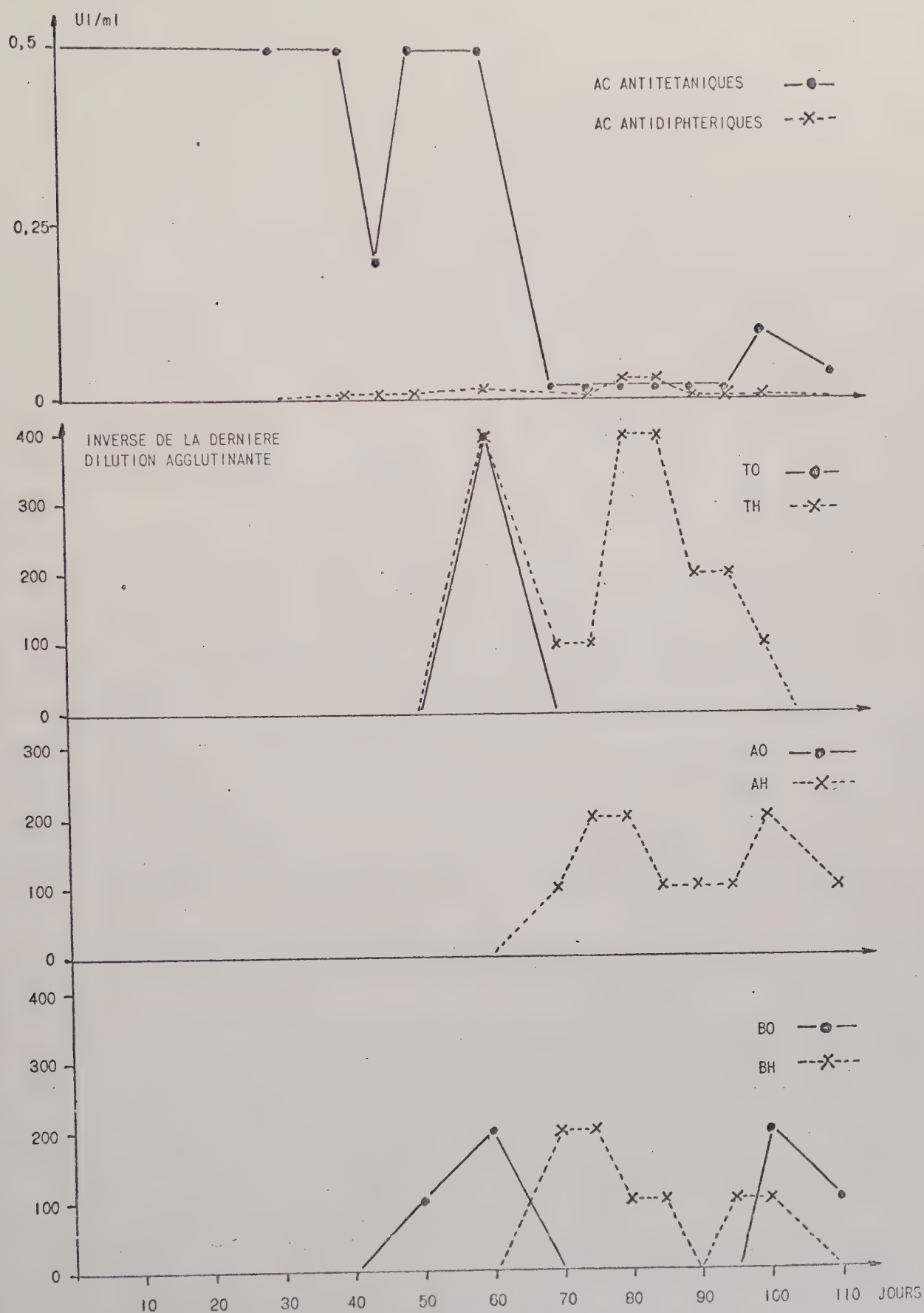
Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,03	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,08	0	0	0	10	0	0
30	*	0	0,133	90	50	0	20	50	0
40		0,100	0,250	120	60	10	30	50	20
50		0,158	0,40	167	78	67	45	100	111
55		0,120	0,411	188	63	13	38	88	13
60		0,234	0,40	125	88	0	38	63	0
80		1	0,35	375	88	50	13	113	38
90		0,875	0,32	375	150	75	50	113	50
95		0	0,11	163	25	0	25	50	0
100		0	0,10	100	13	0	13	0	0
110		0	0,20	75	0	0	0	0	0

- Tableau N° 49 -

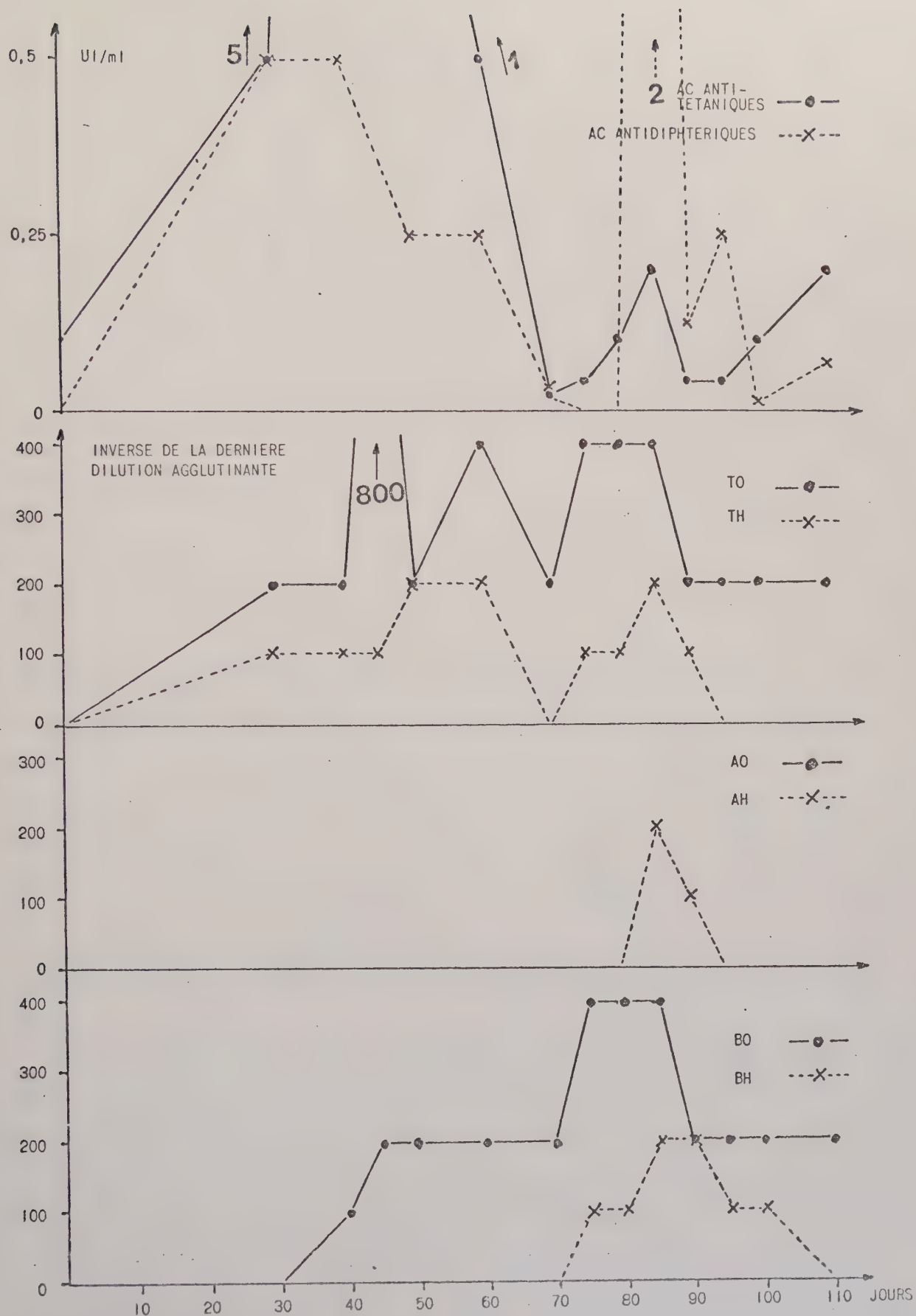
MOYENNES DES TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES, ANTITETANIQUES,
ANTI S. TYPHI et PARATYPHI A et B

- Formule IV : BM + PAD - Lapins N° 1 à 10 -

Jours	Imm	Ac anti D UI/ml	Ac anti T UI/ml	Ac anti S. typhi et paratyphi AB inverse de la dernière dilution agglutinante					
				TO	TH	AO	AH	BO	BH
0	*	0	0,07	0	0	0	0	0	0
15	*	0	0,07	10	0	0	0	10	0
30	*	0,014	0,30	100	33	22	0	55	0
40		0,020	0,35	87	25	0	0	63	0
50		0,085	0,30	137	37	13	0	63	13
55		0,107	0,22	150	75	13	0	63	0
60		0,107	0,21	150	63	25	25	75	0
80		1,17	0,22	400	86	71	28	200	57
90		1	0,18	300	83	83	33	200	150
95		0	0,17	140	60	20	20	140	40
100		0	0,06	100	20	20	20	60	0
110		0	0,11	60	0	20	0	20	0

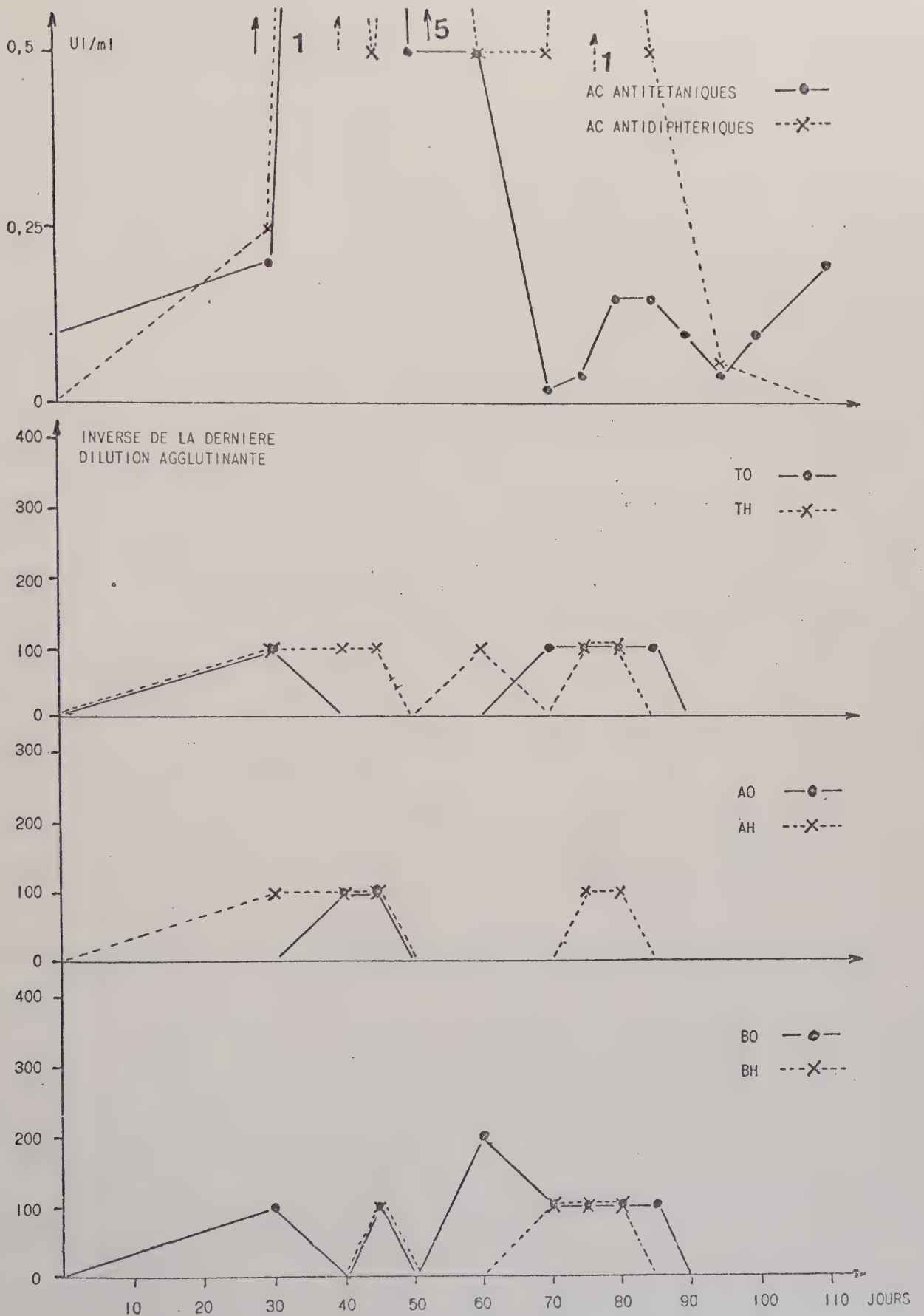


Graphe N° 1 : COURBES D'IMMUNISATION
Formule I : AM - Lapin N° 721



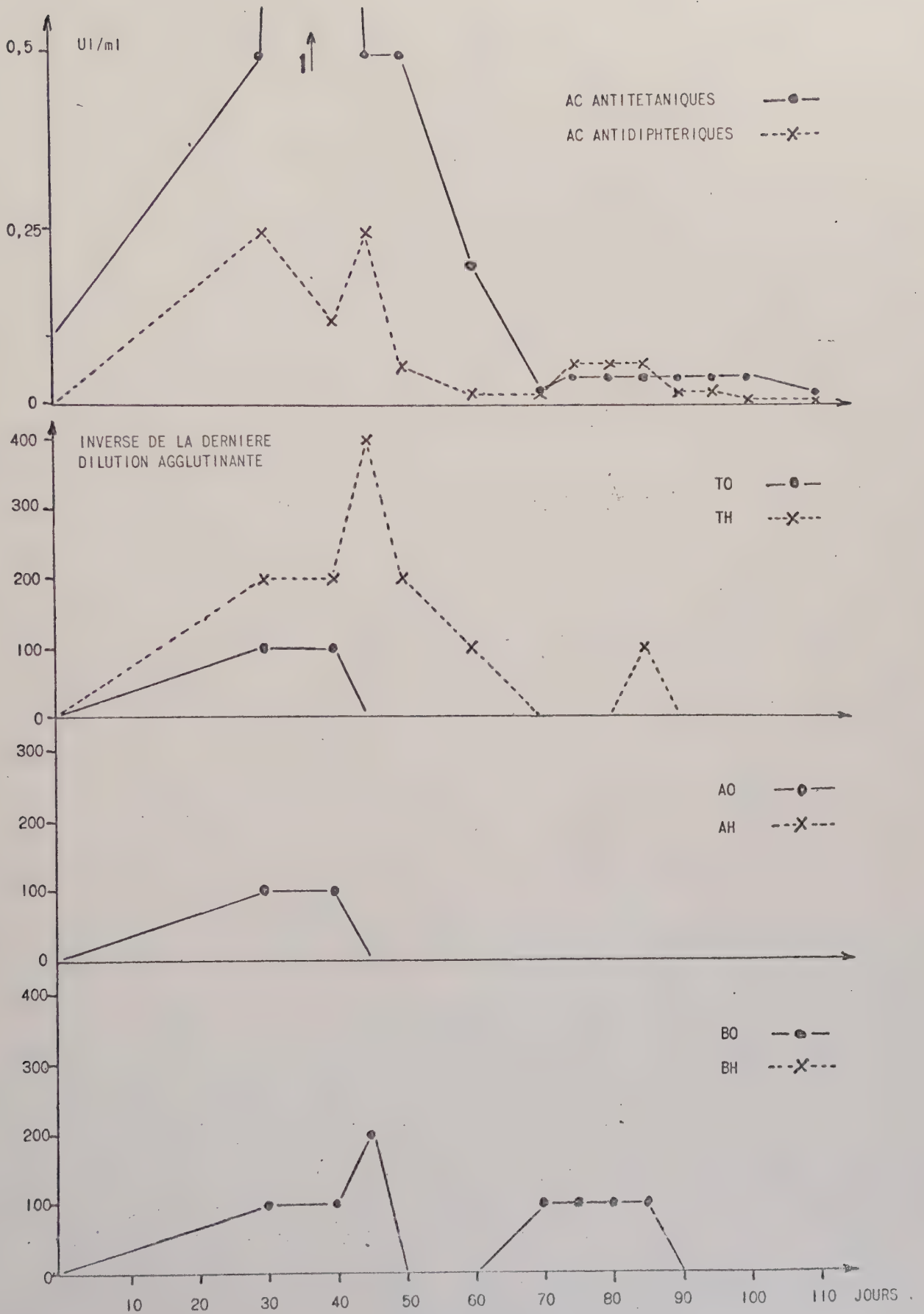
Graphe N° 2 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule I : AM - Lapin N° 722



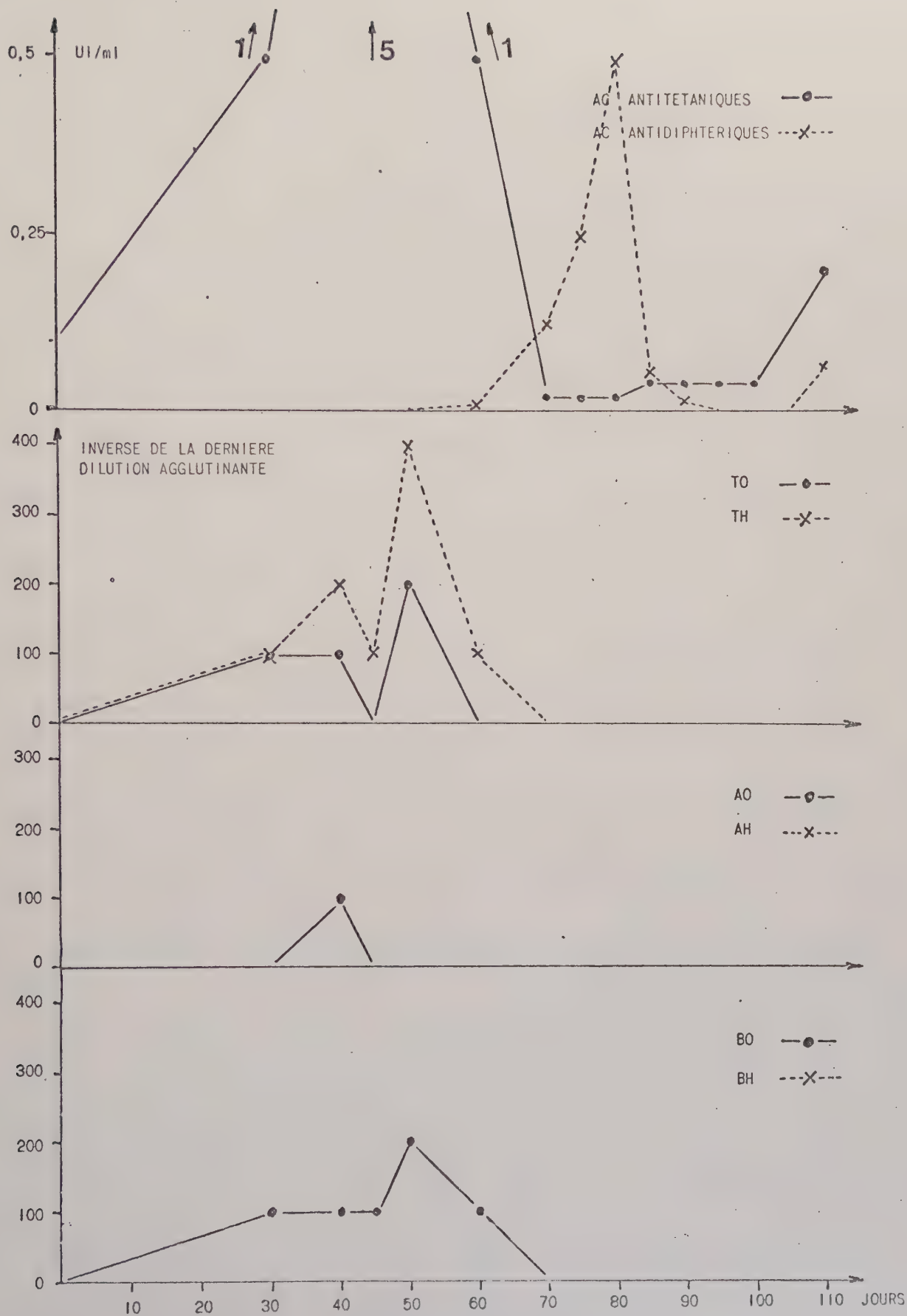
Graphe N° 3 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule I : AM - Lapin N° 723



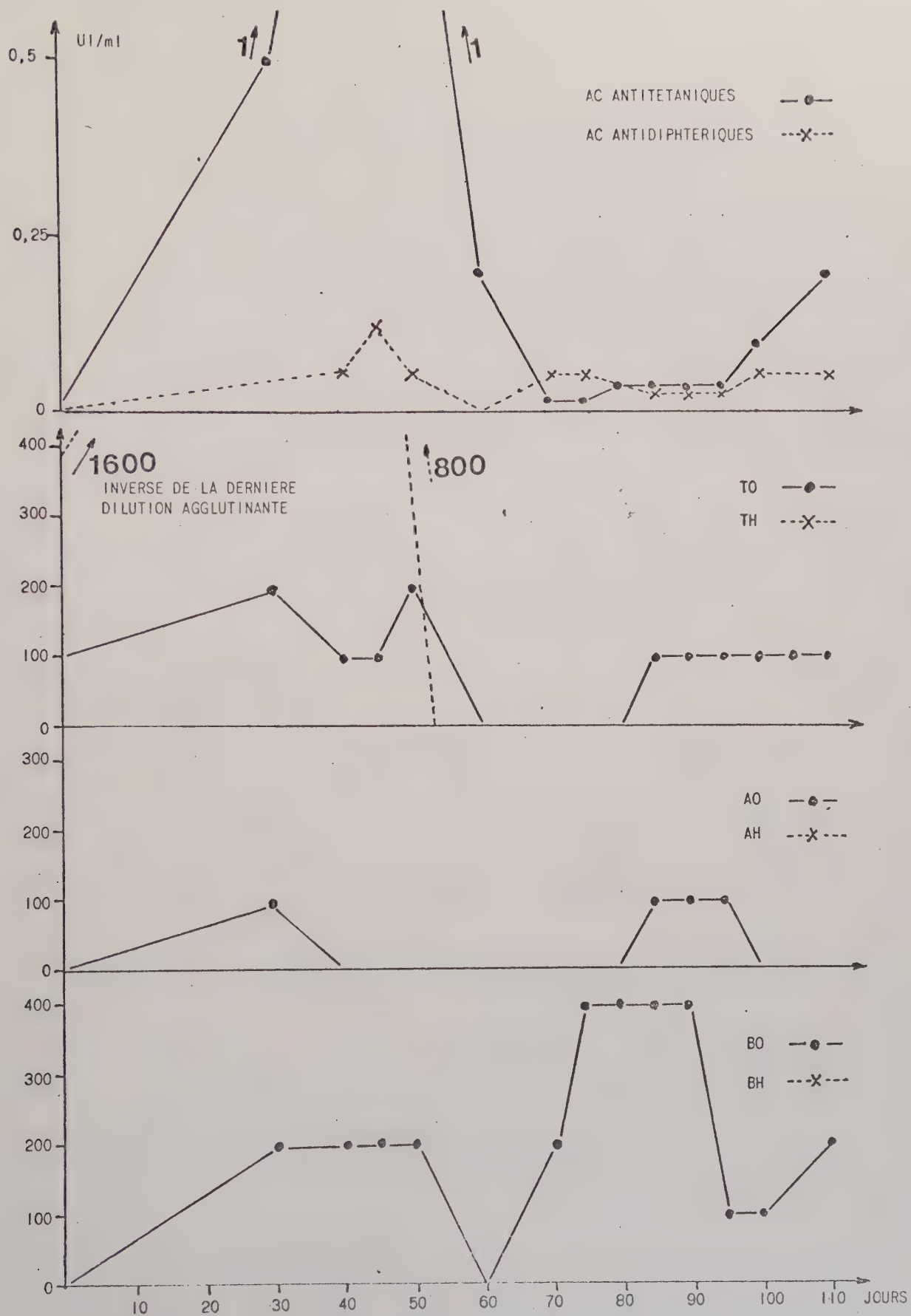
Graphe N° 4 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule I : AM - Lapin N° 724



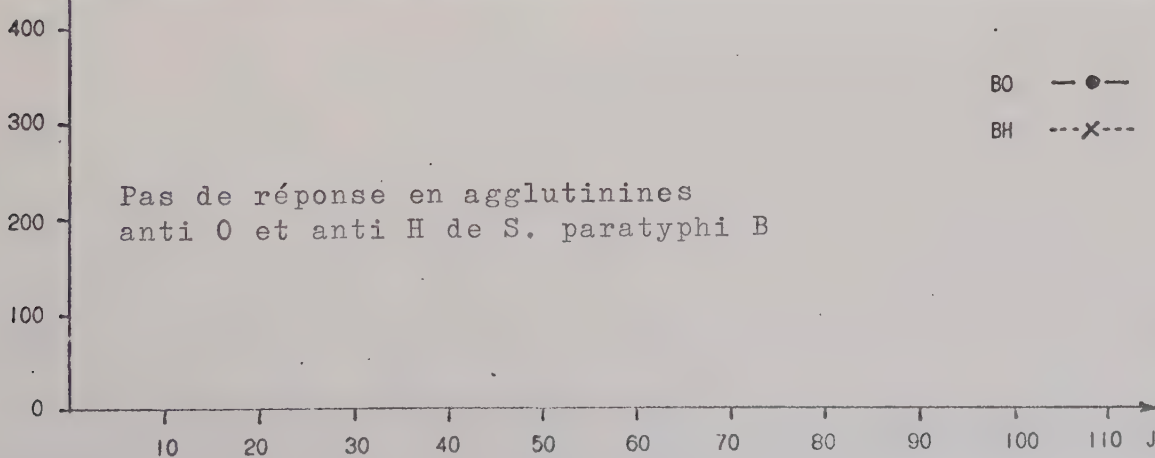
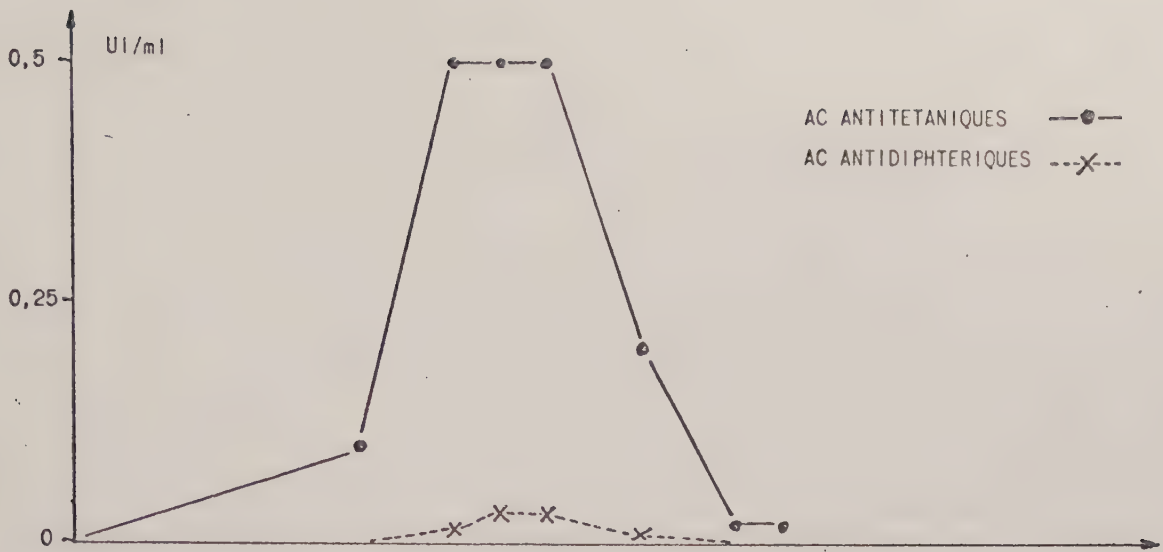
Graphe N° 5 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule I : AM - Lapin N° 725



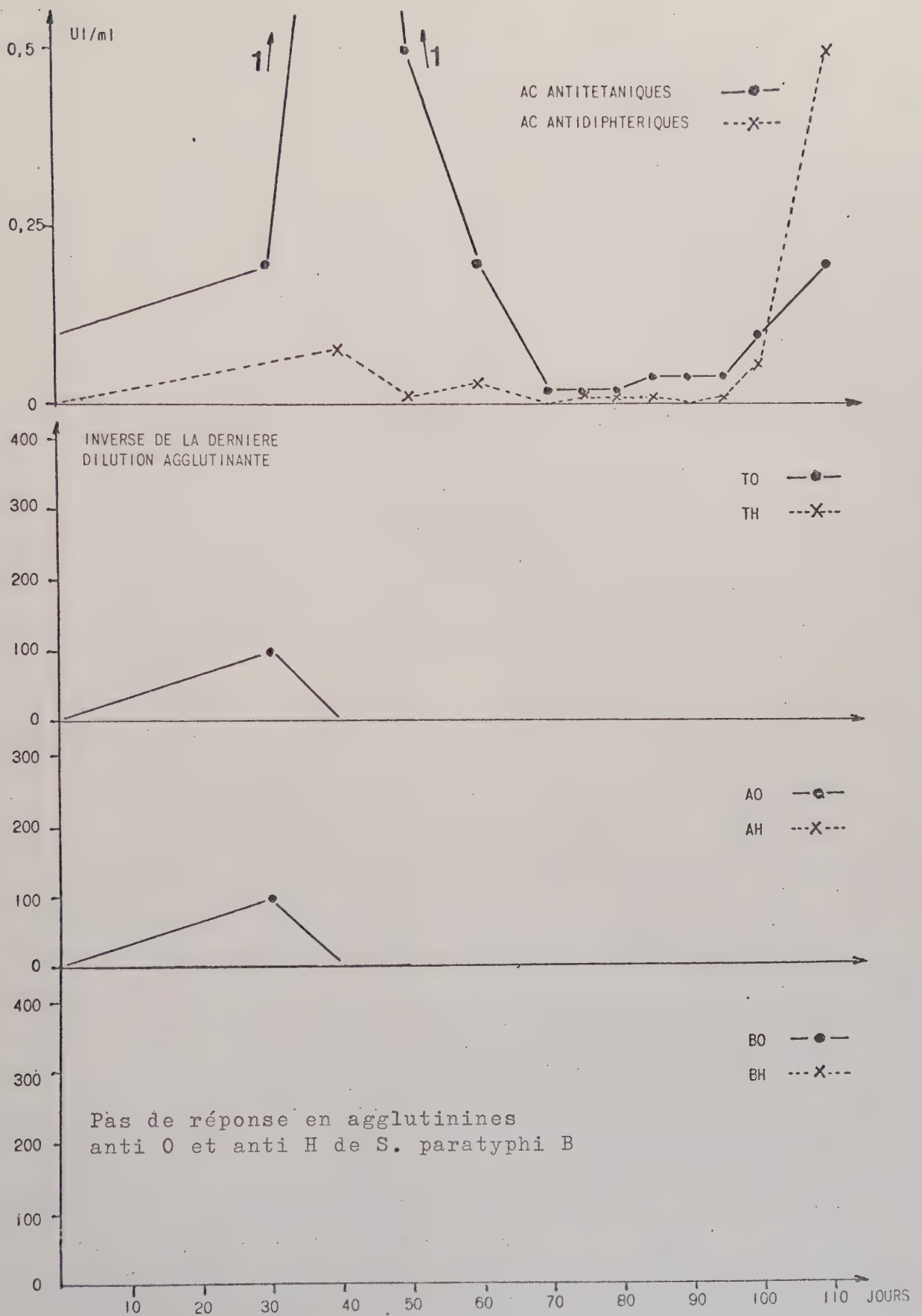
Graphe N° 6 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule I : AM - Lapin N° 731



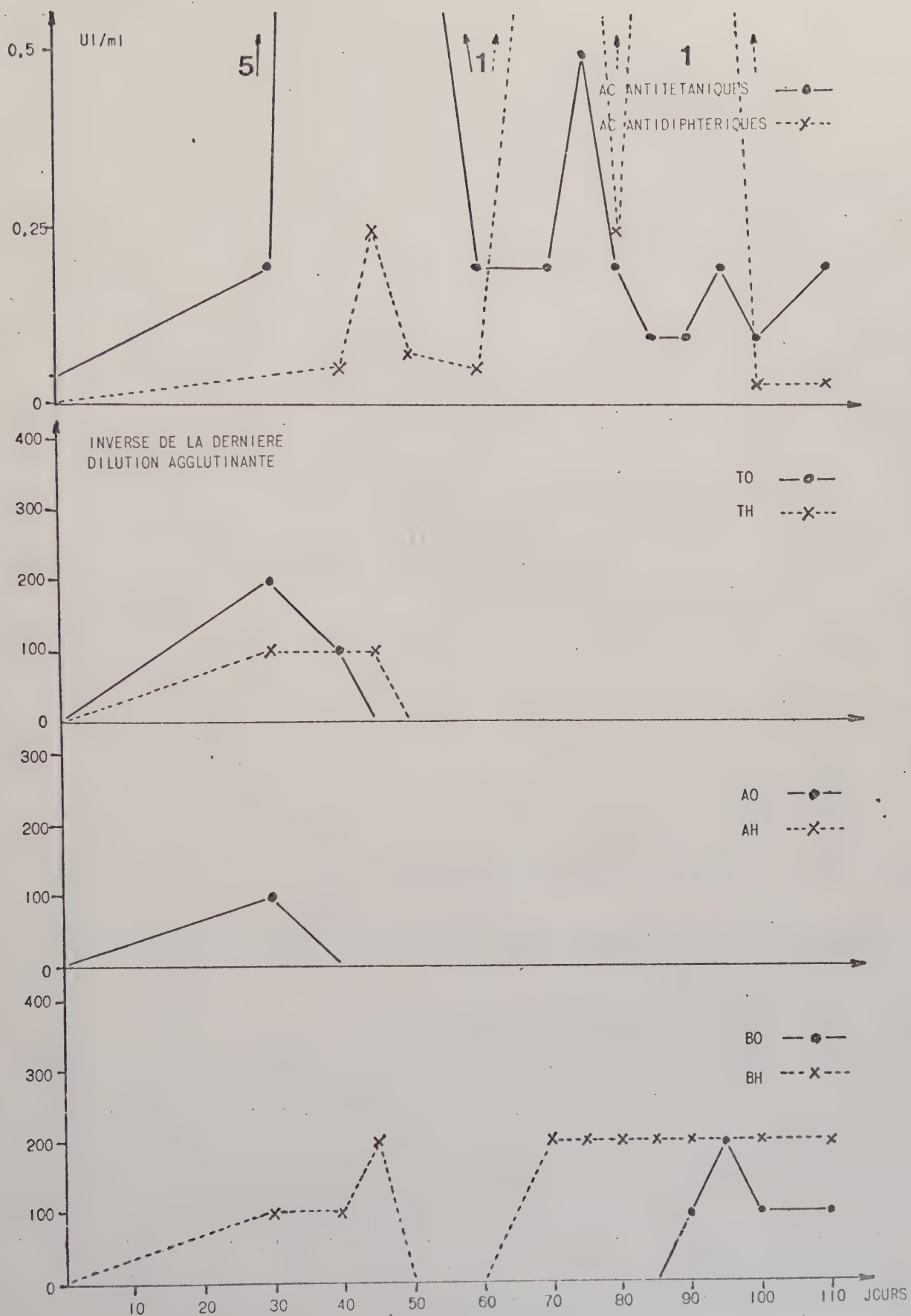
Graphe N° 7 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule I : AM - Lapin N° 732



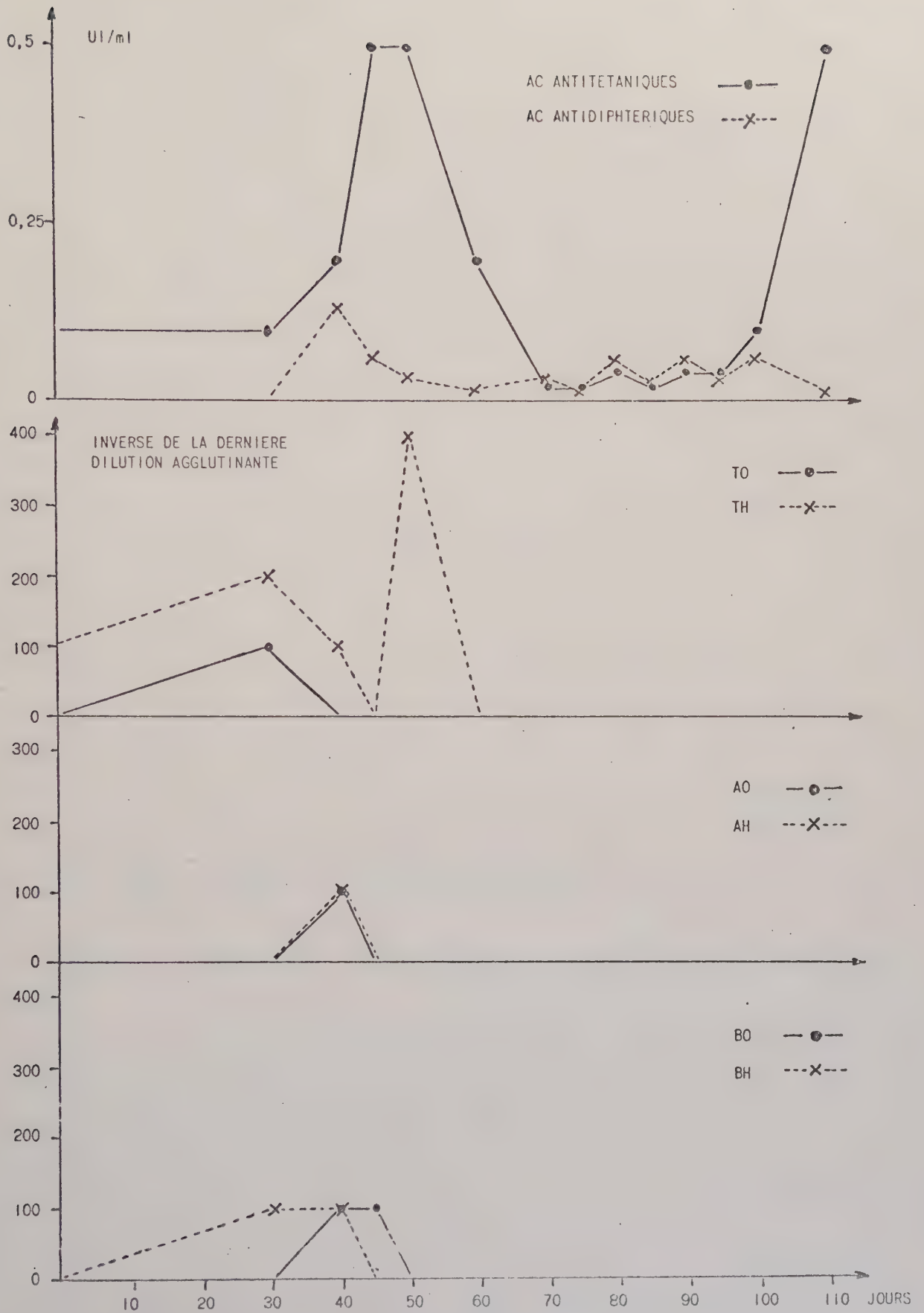
Graphe N° 8 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule I : AM - Lapin N° 733



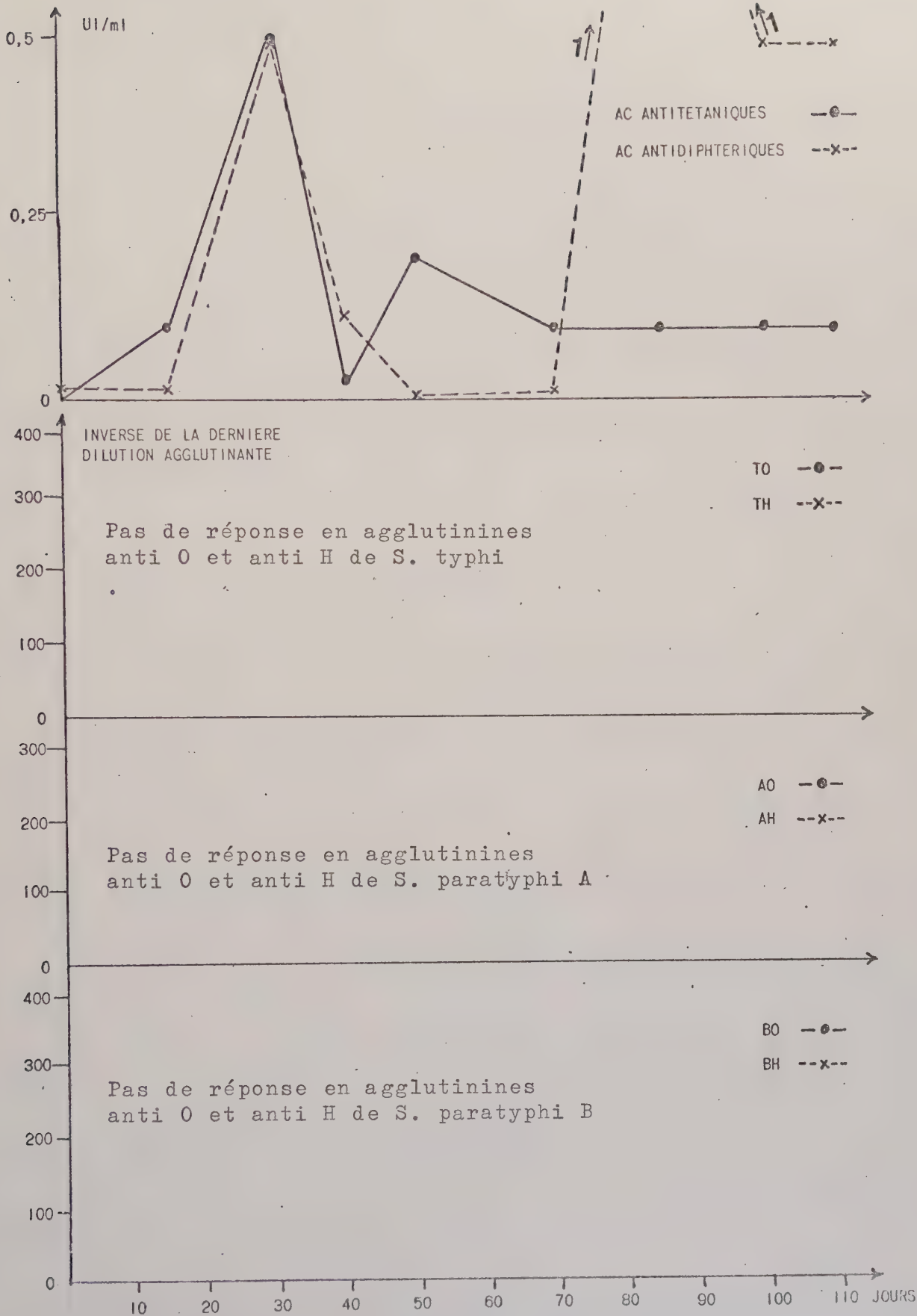
Graphe N° 9 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule I : AM - Lapin N° 734



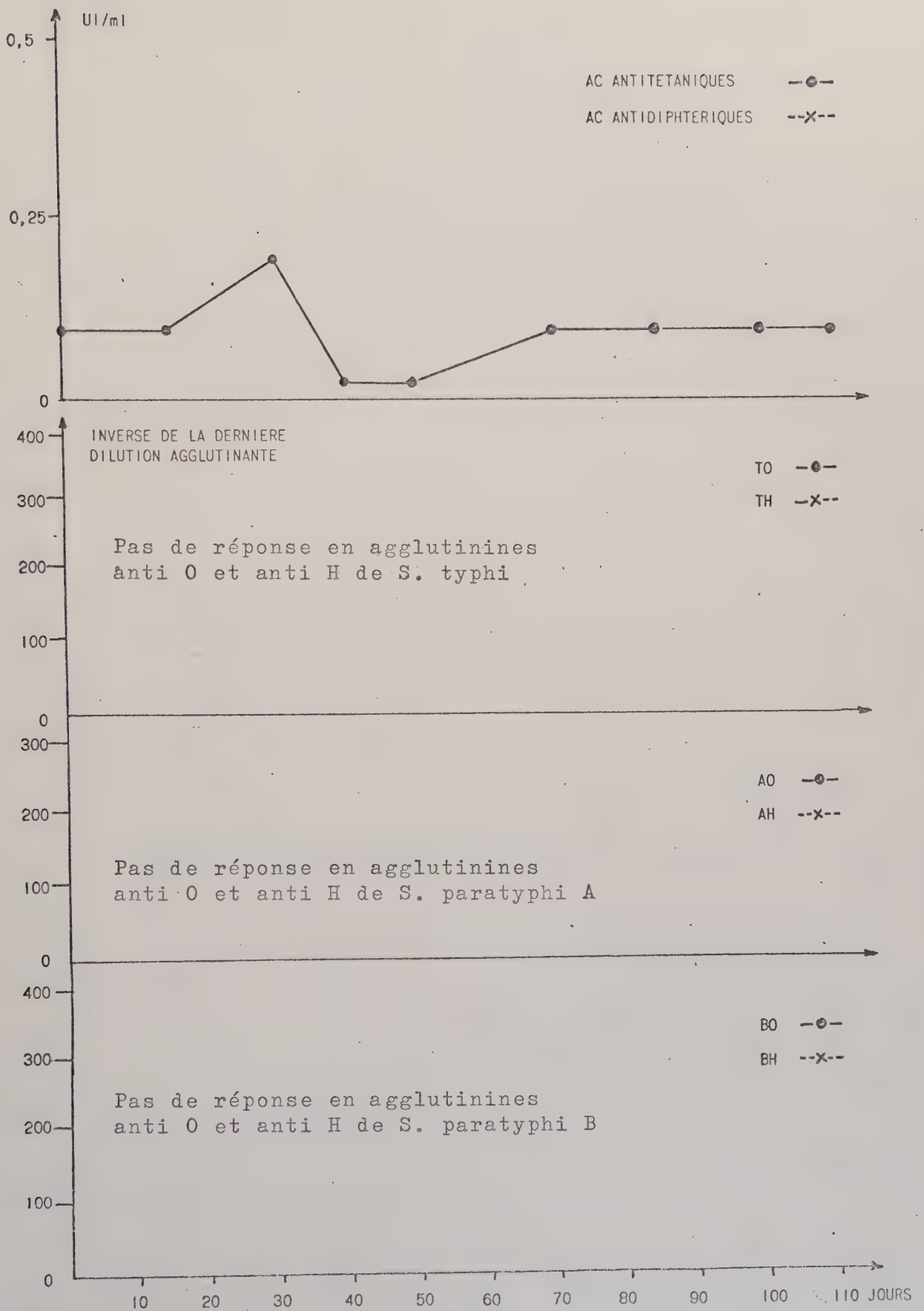
Graphe N° 10 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule I : AM - Lapin N° 735



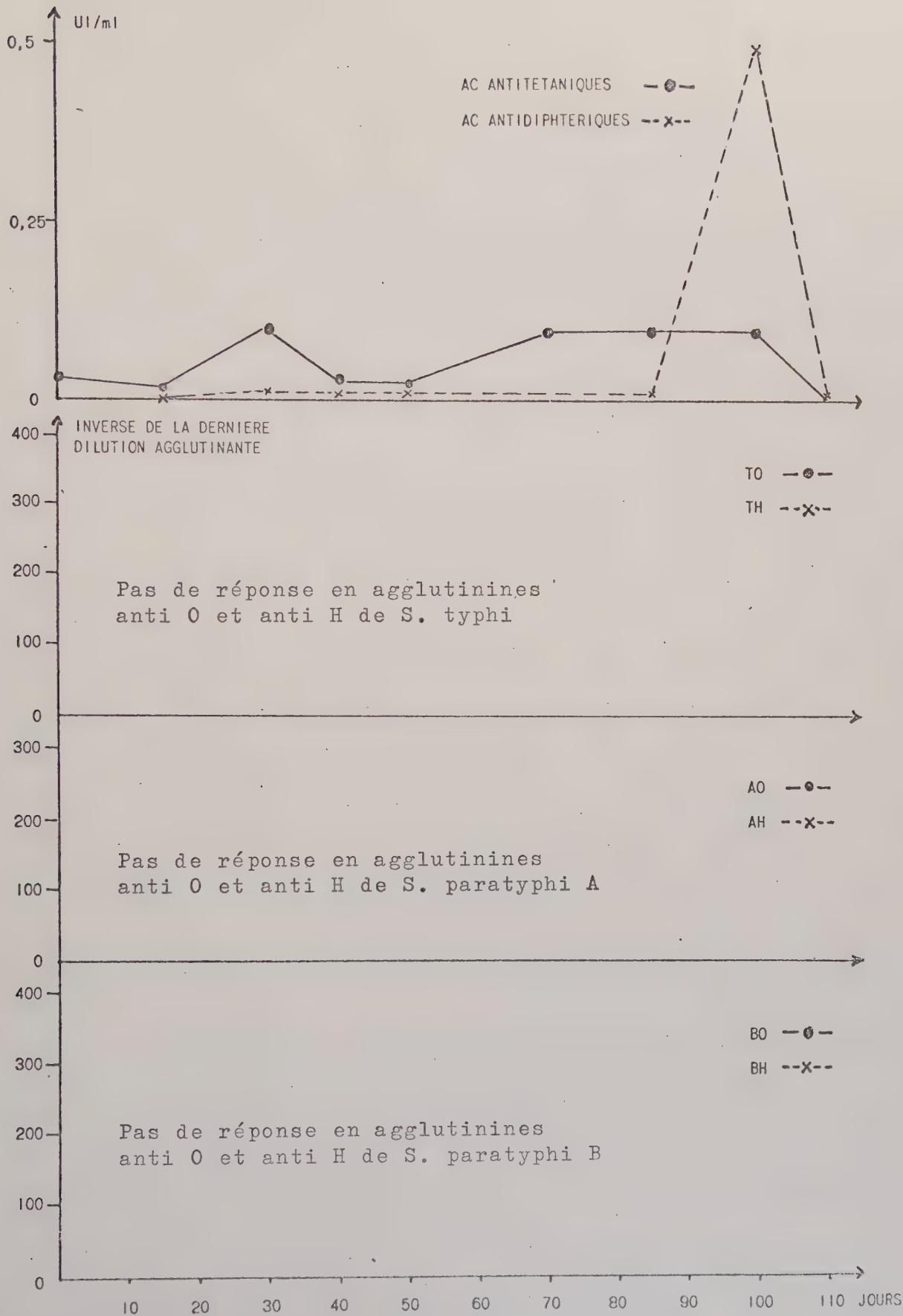
Graphe N° 11 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule II : AS₂X - Lapin N° 243



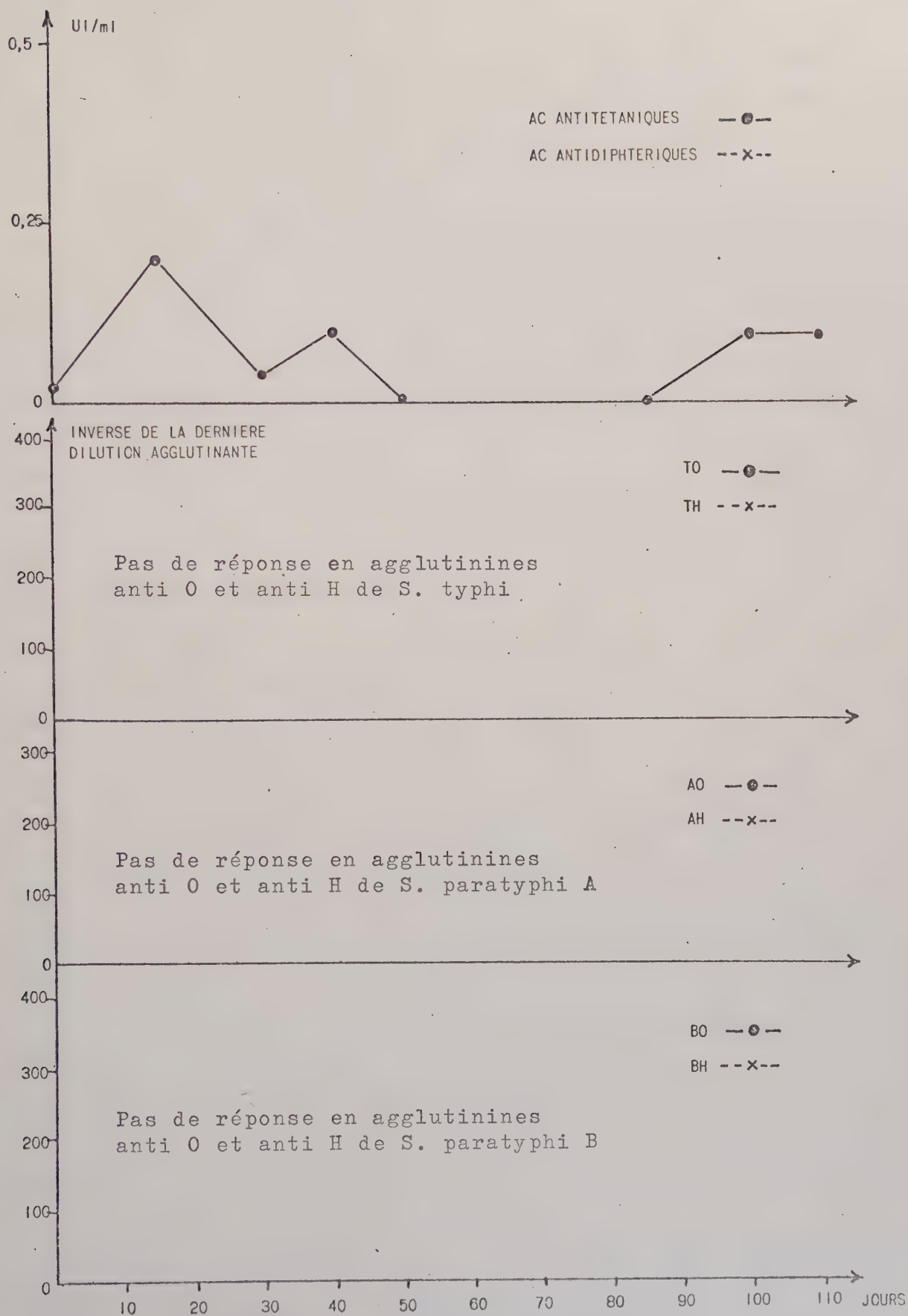
Graphe N° 12 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule II : AS₂X - Lapin N° 244



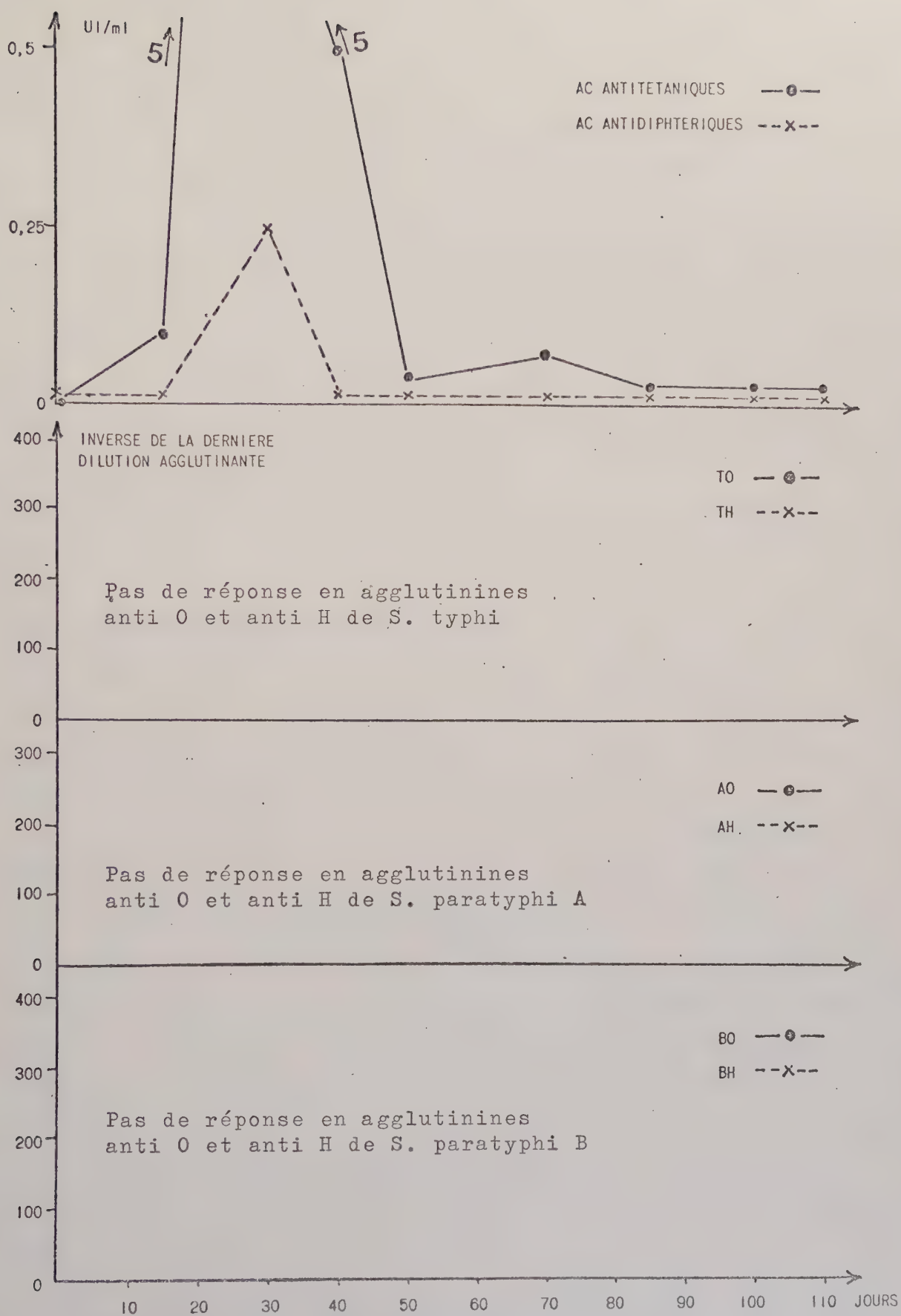
Graphe N° 13 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule II : AS₂X - Lapin N° 245



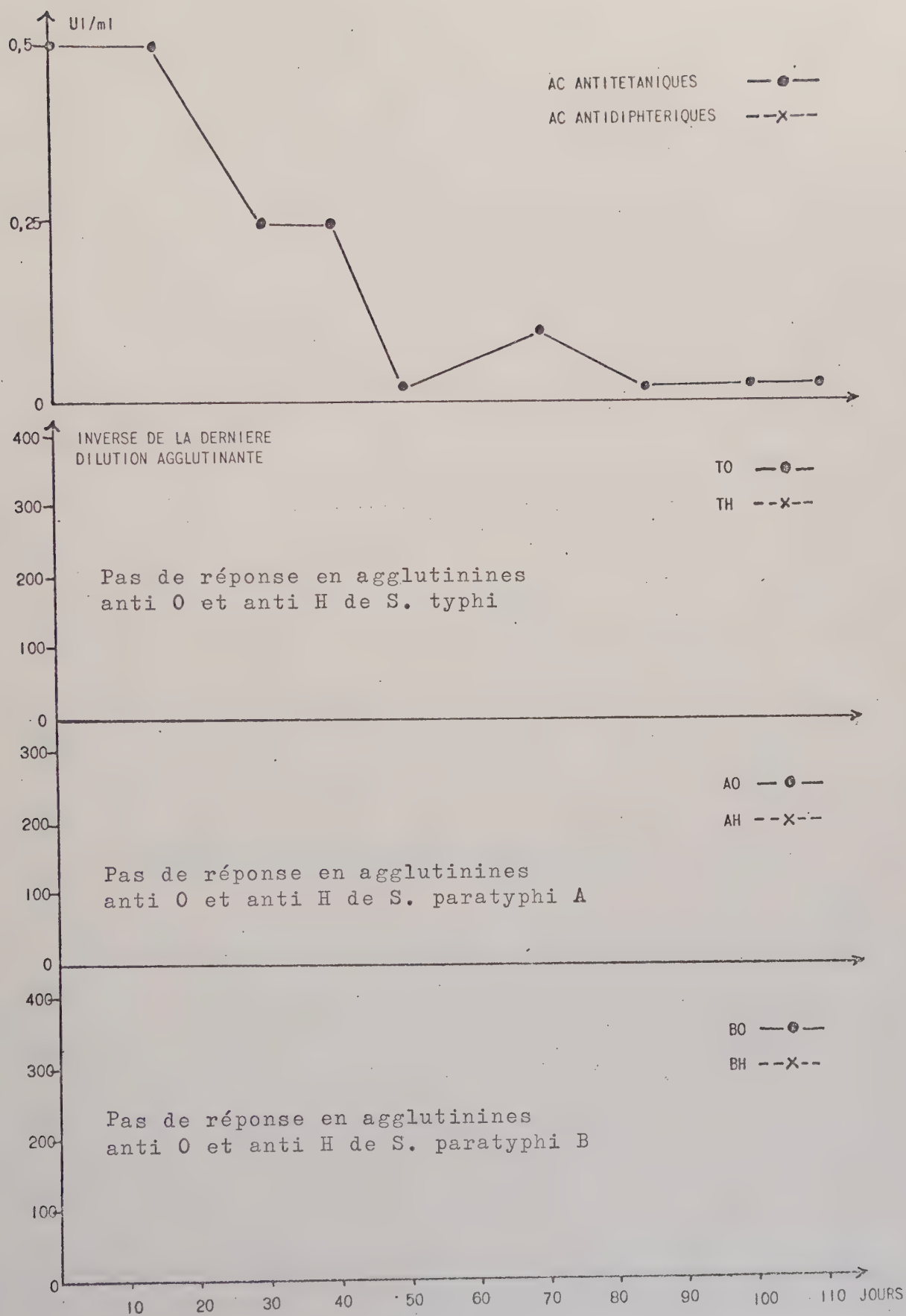
Graphe N° 14 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule II : AS₂X - Lapin N° 246



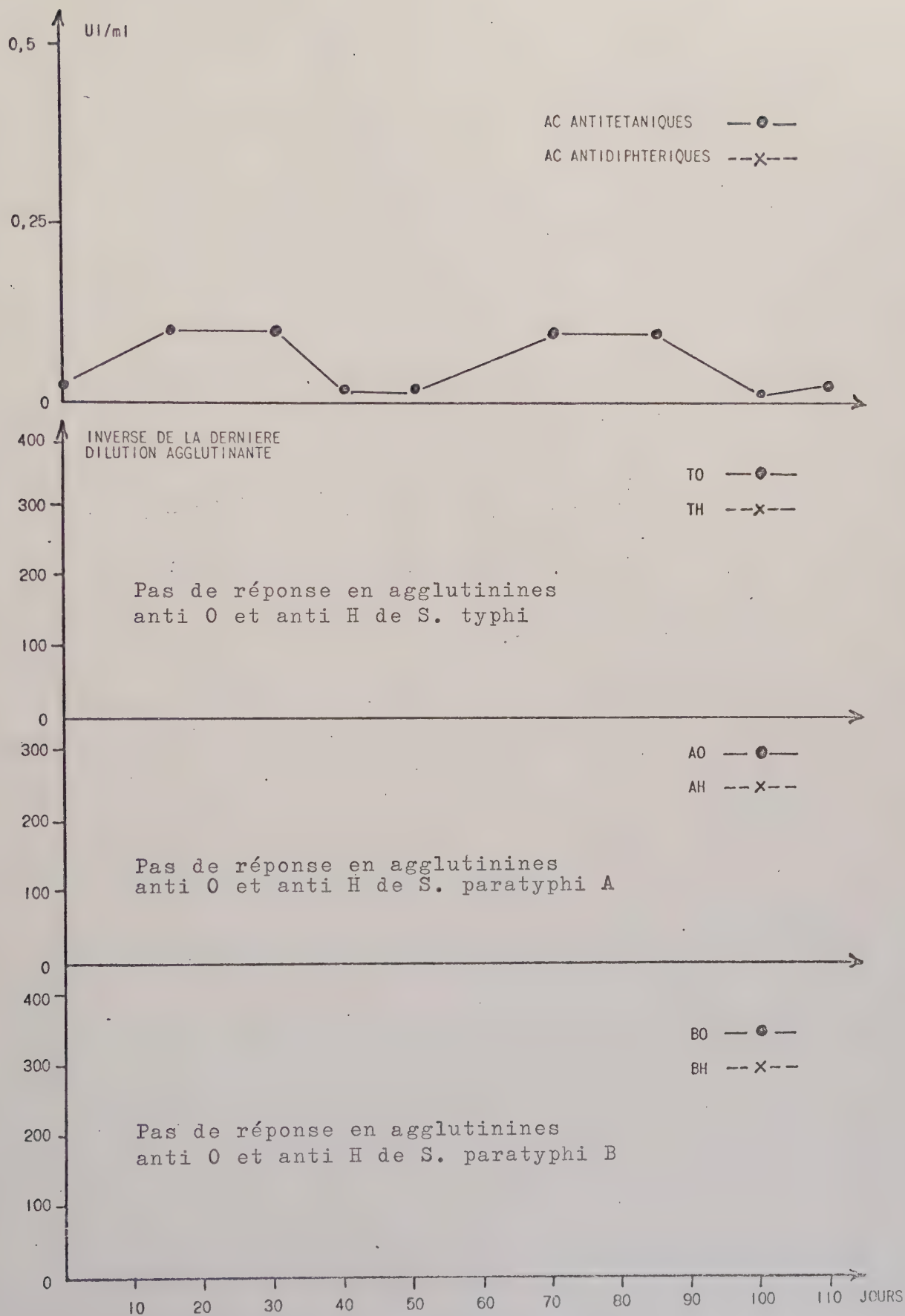
Graphe N° 15 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule II : AS₂X - Lapin N° 247



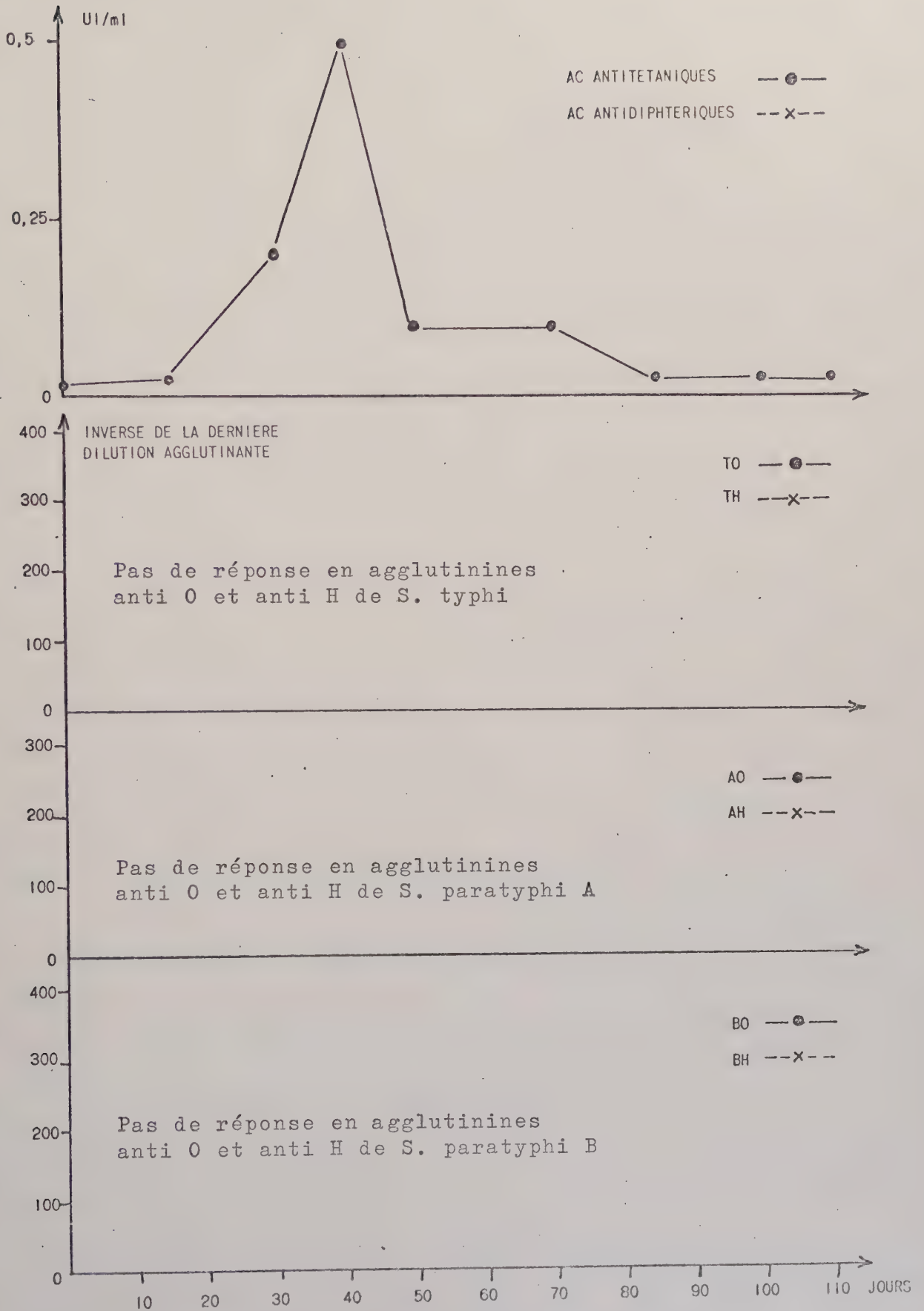
Graphe N° 16 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule II : AS₂X - Lapin N° 248



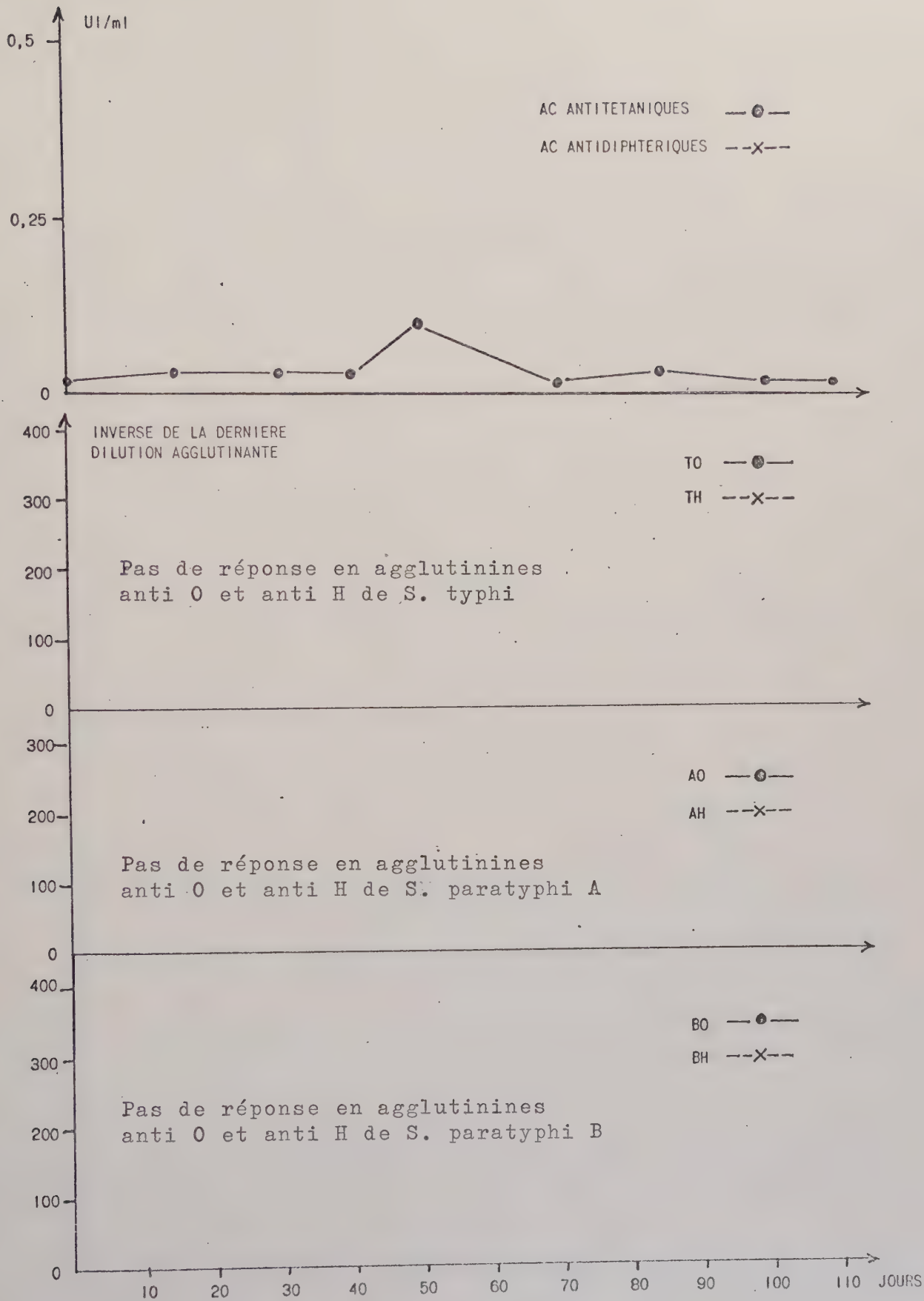
Graphe N° 17 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule II : AS₂X - Lapin N° 249



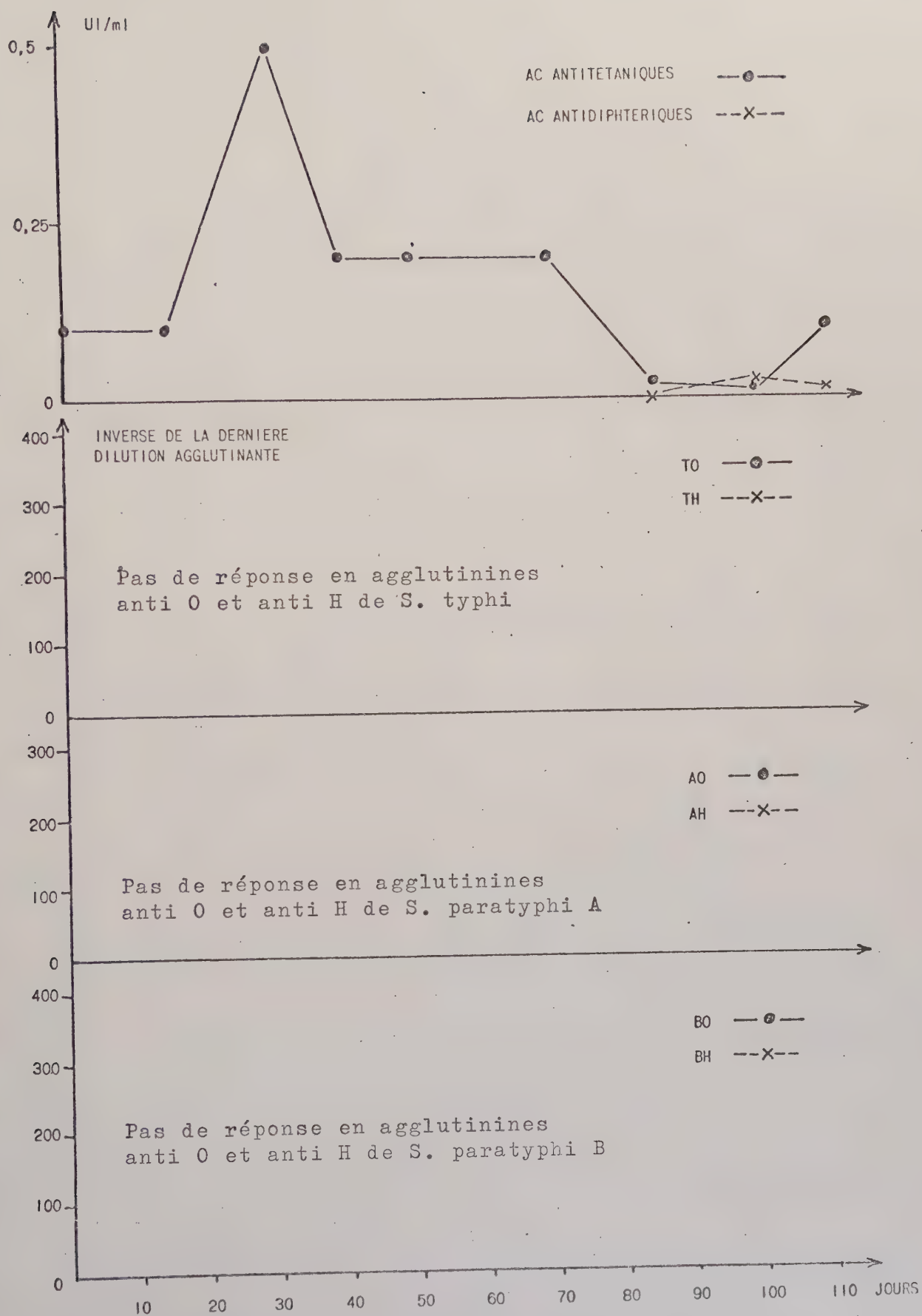
Graphe N° 18 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule II : AS₂S - Lapin N° 250



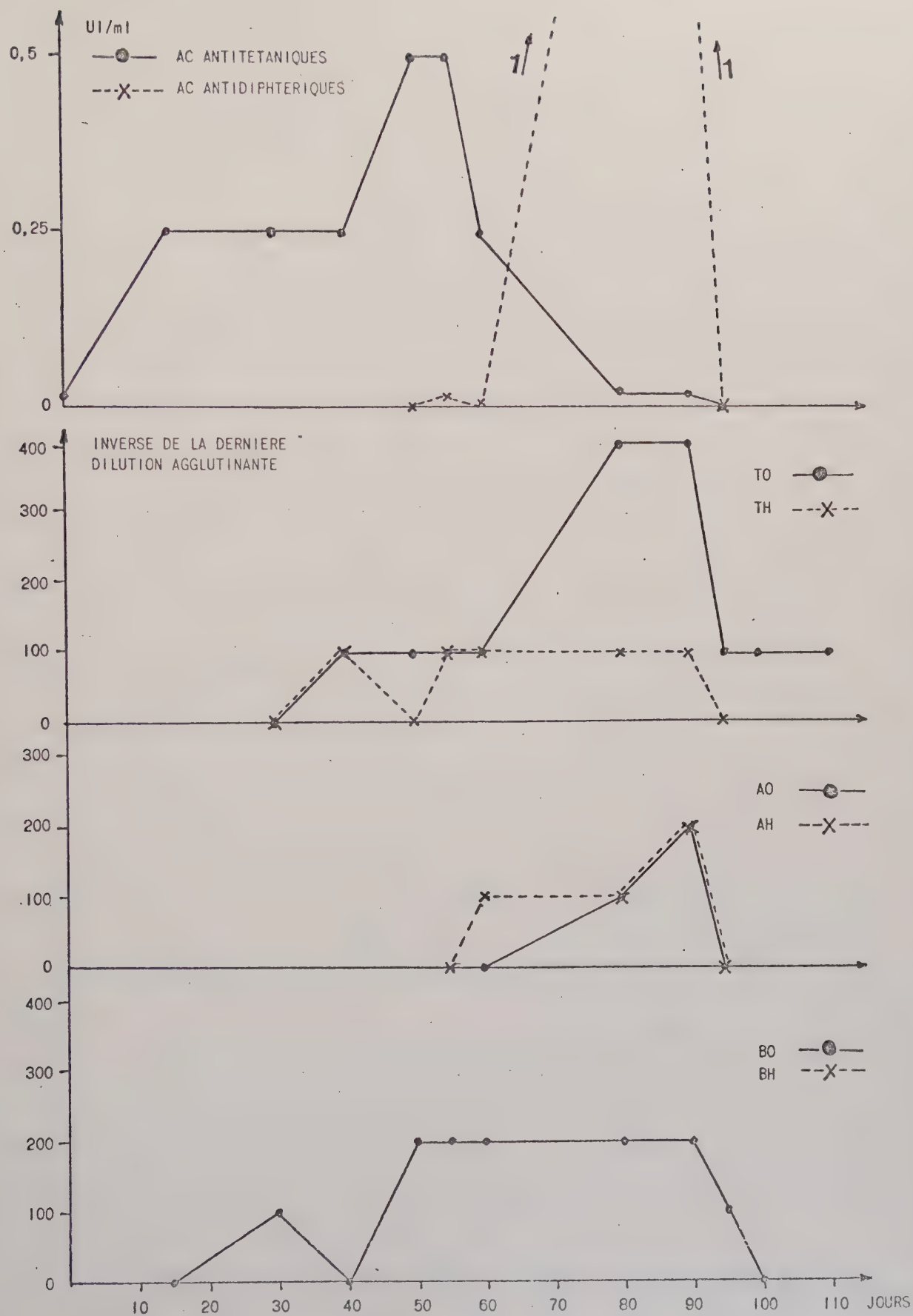
Graphe N° 19 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule II : AS₂X - Lapin N° 251



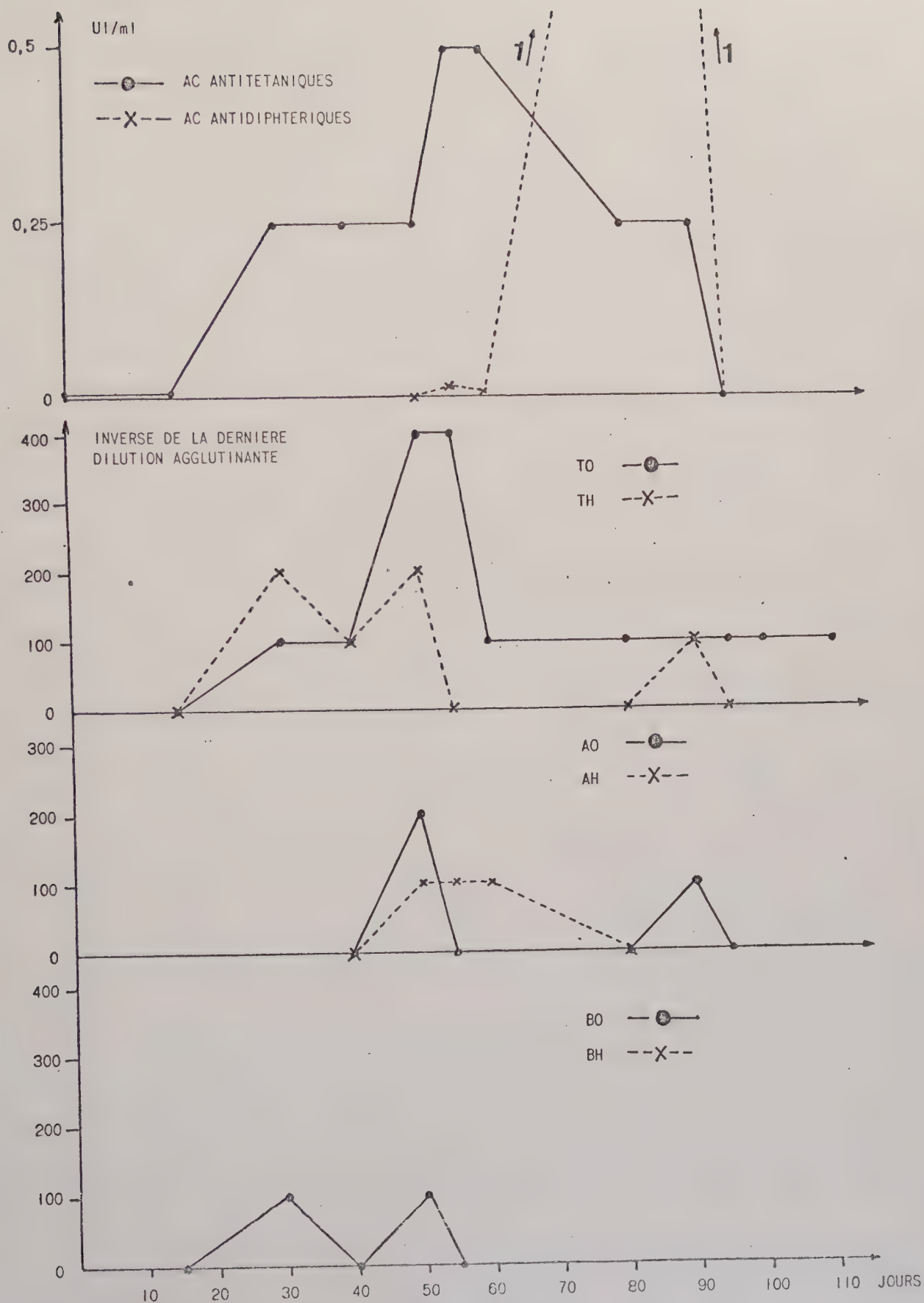
Graphe N° 20 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule II : AS₂X - Lapin N° 252



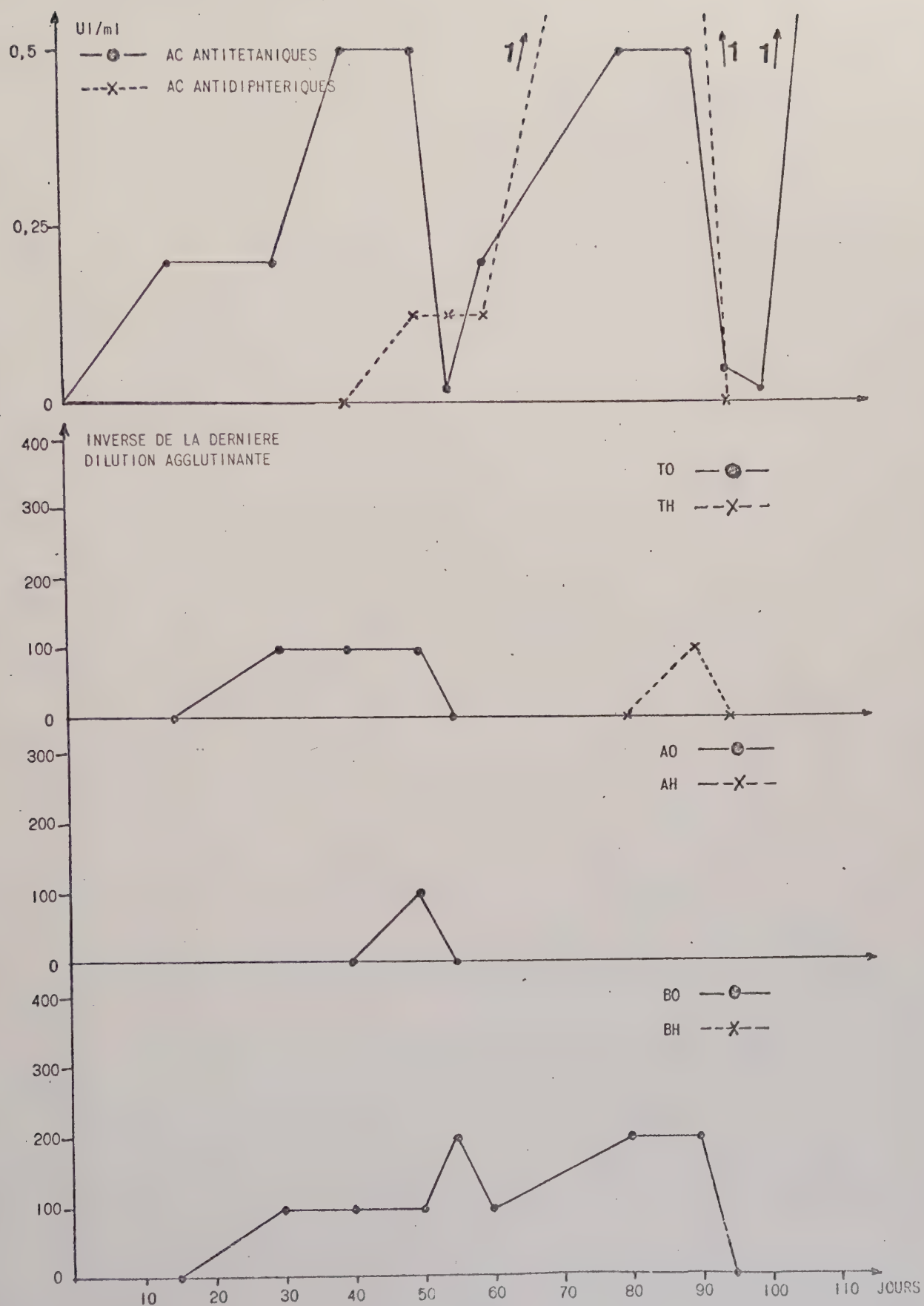
Graphe N° 21 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule III : BM - Lapin N° 761



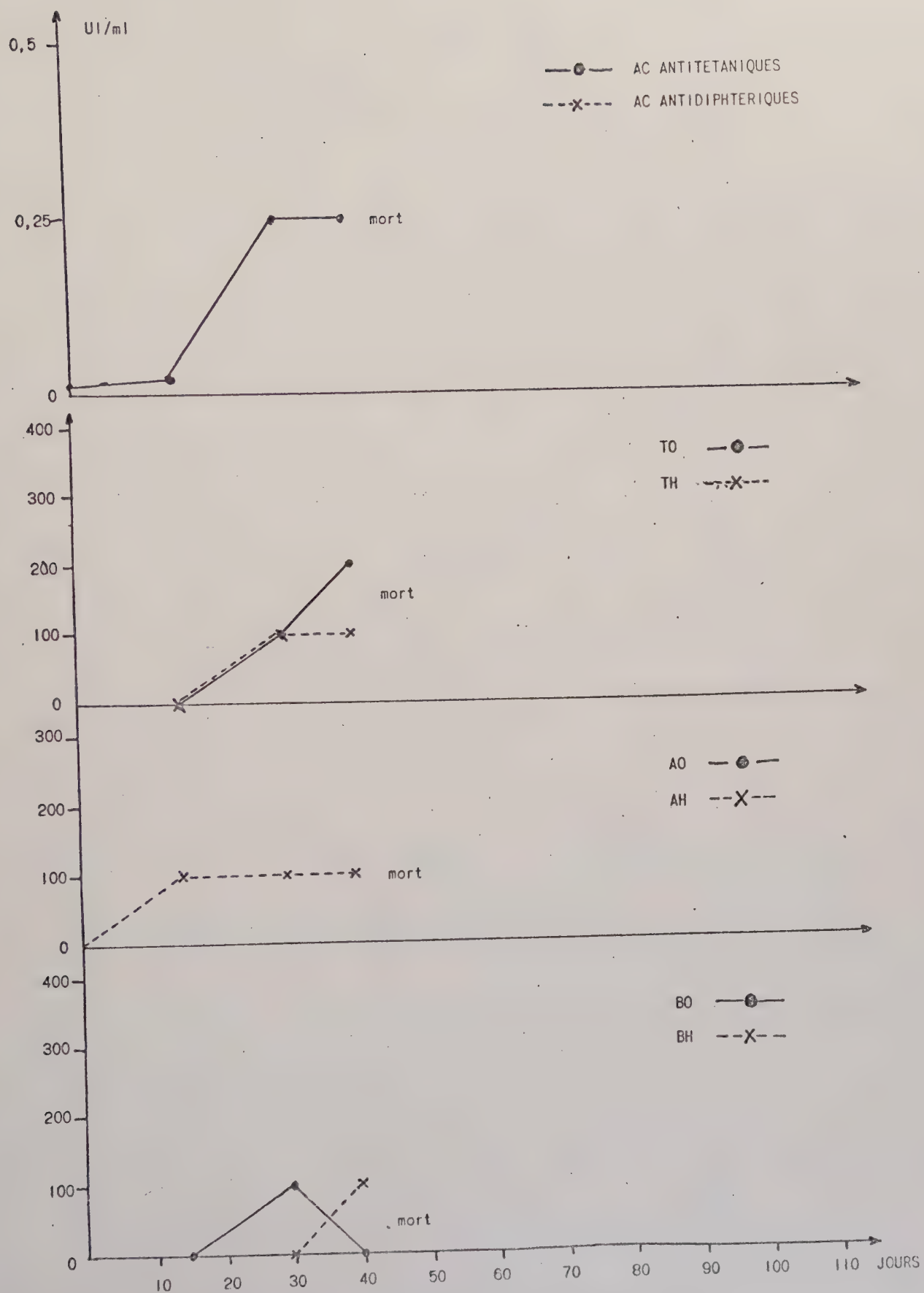
Graphe N° 22 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule III : BM - Lapin N° 762



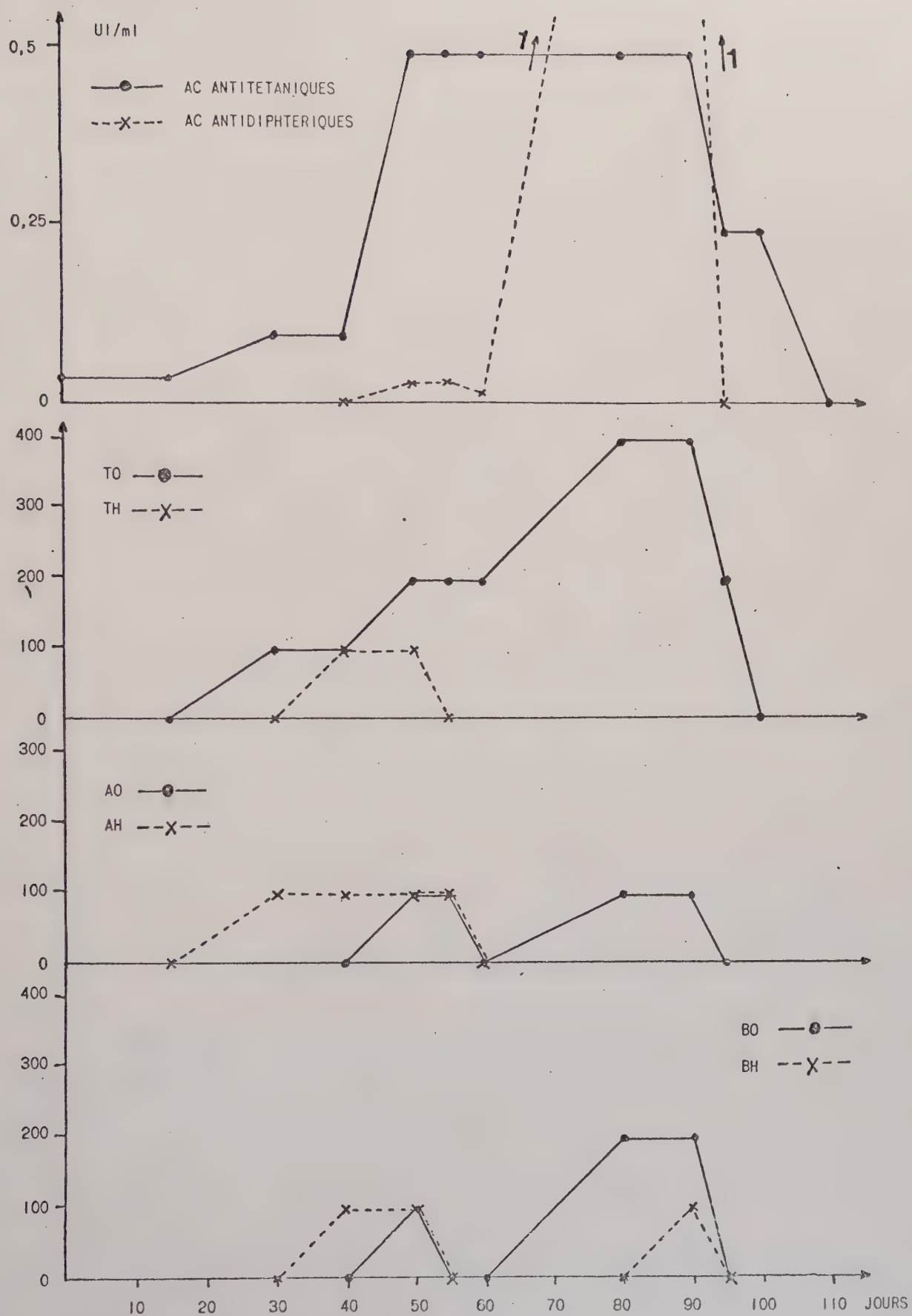
Graphe N° 23 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule III : BM - Lapin N° 763



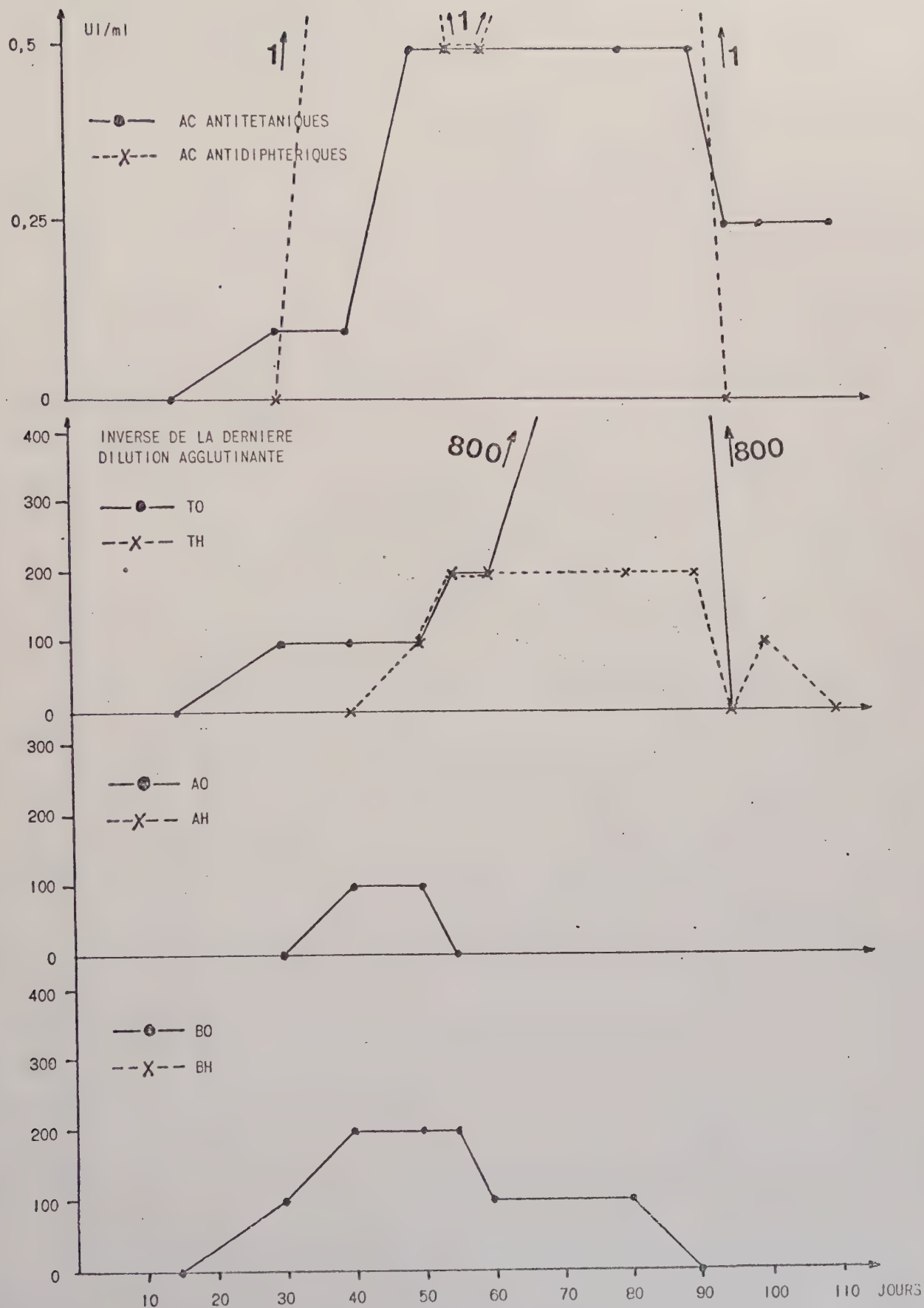
Graphe N° 24 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule III : BM - Lapin N° 764



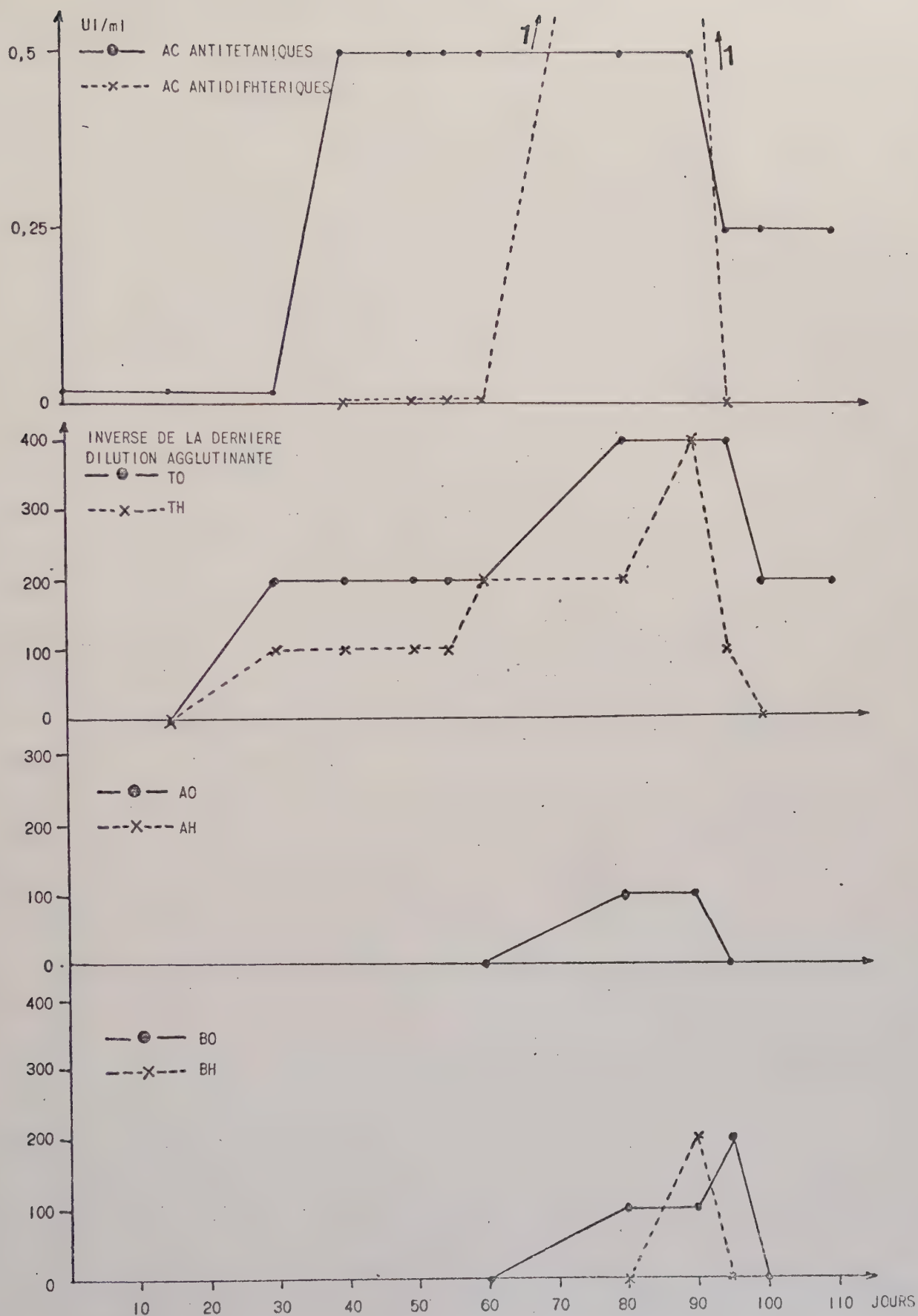
Graphe N° 25 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule III : BM - Lapin N° 765



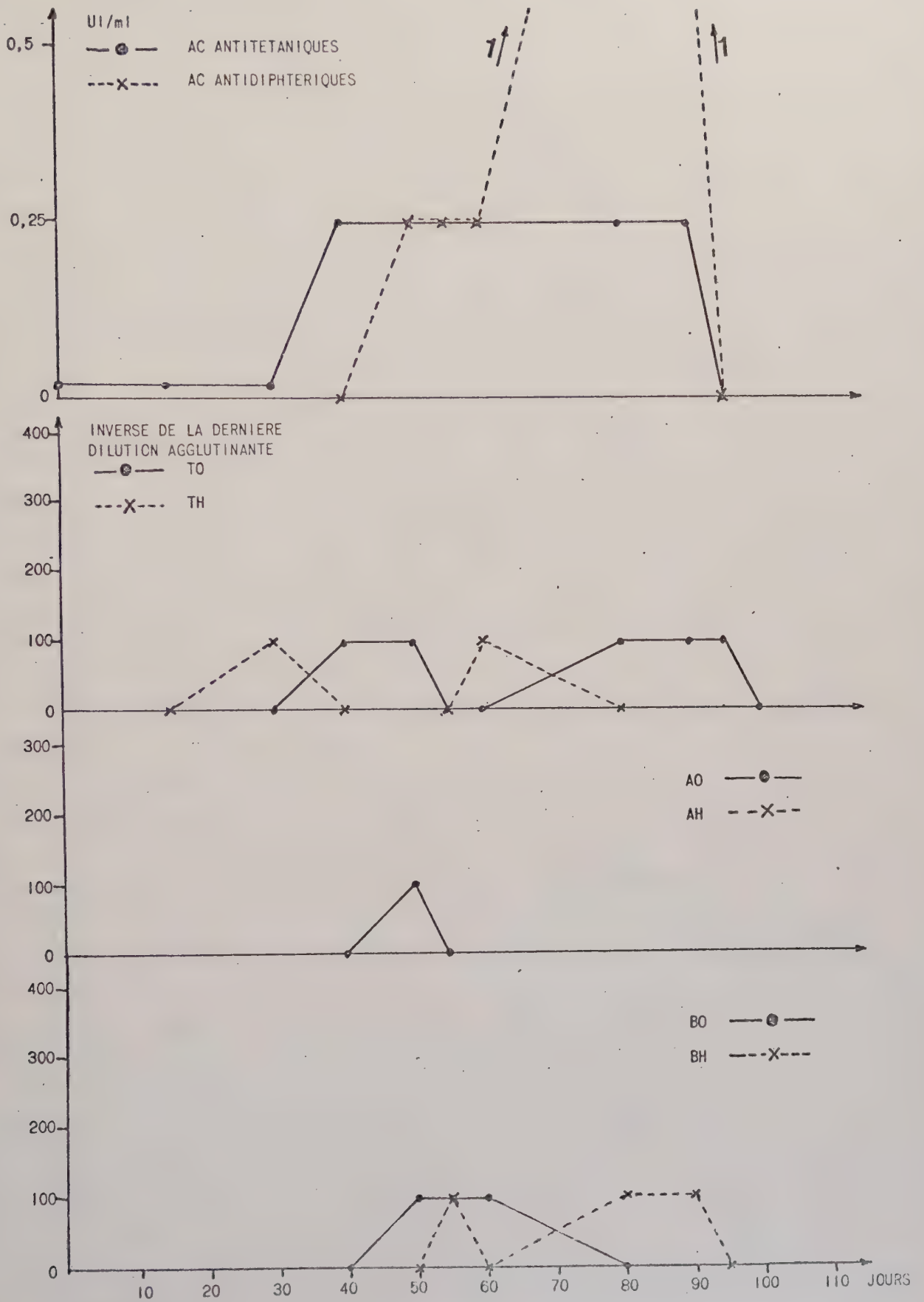
Graphe N° 26 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule III : BM - Lapin N° 766



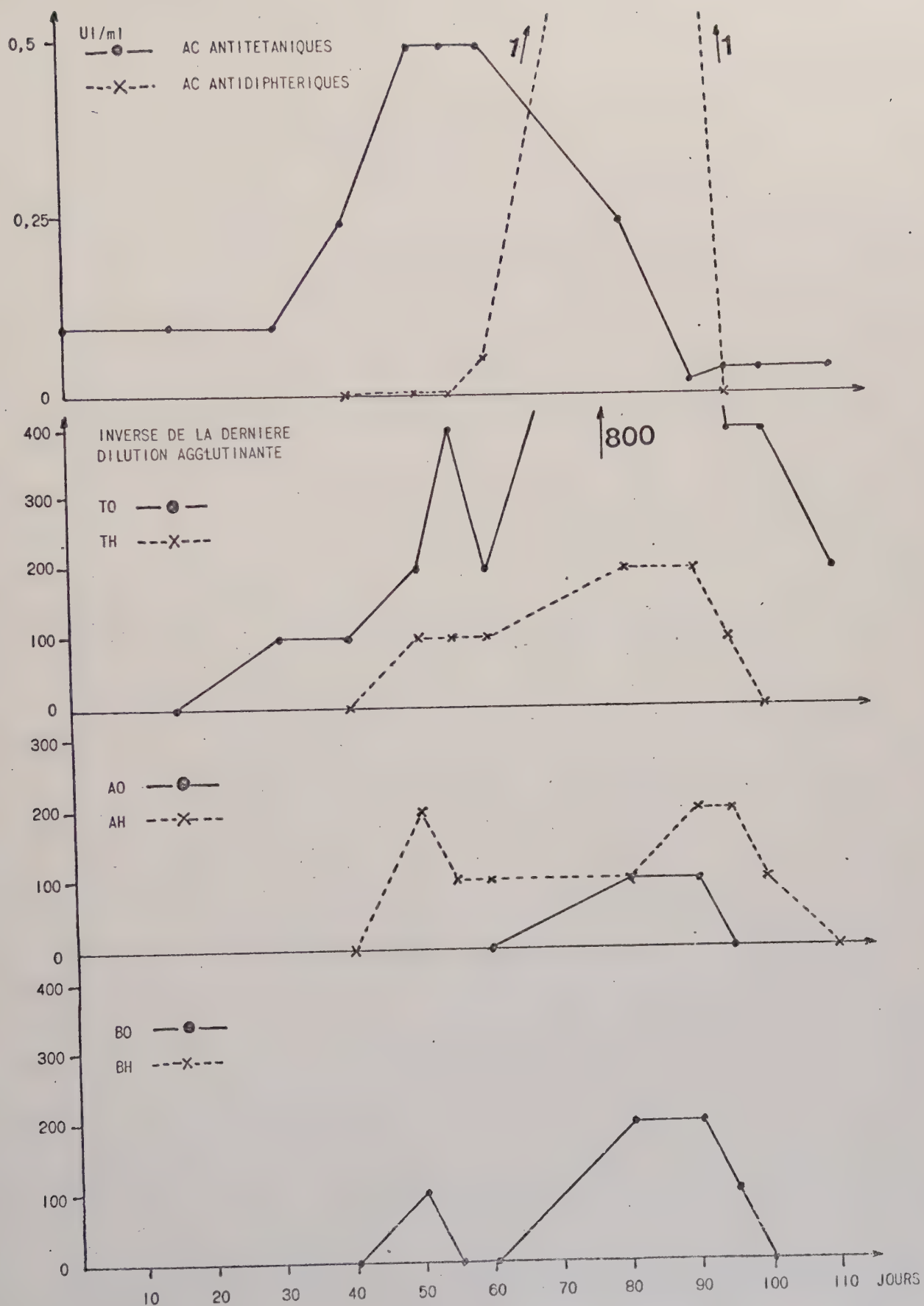
Graphe N° 27 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule III : BM - Lapin N° 767



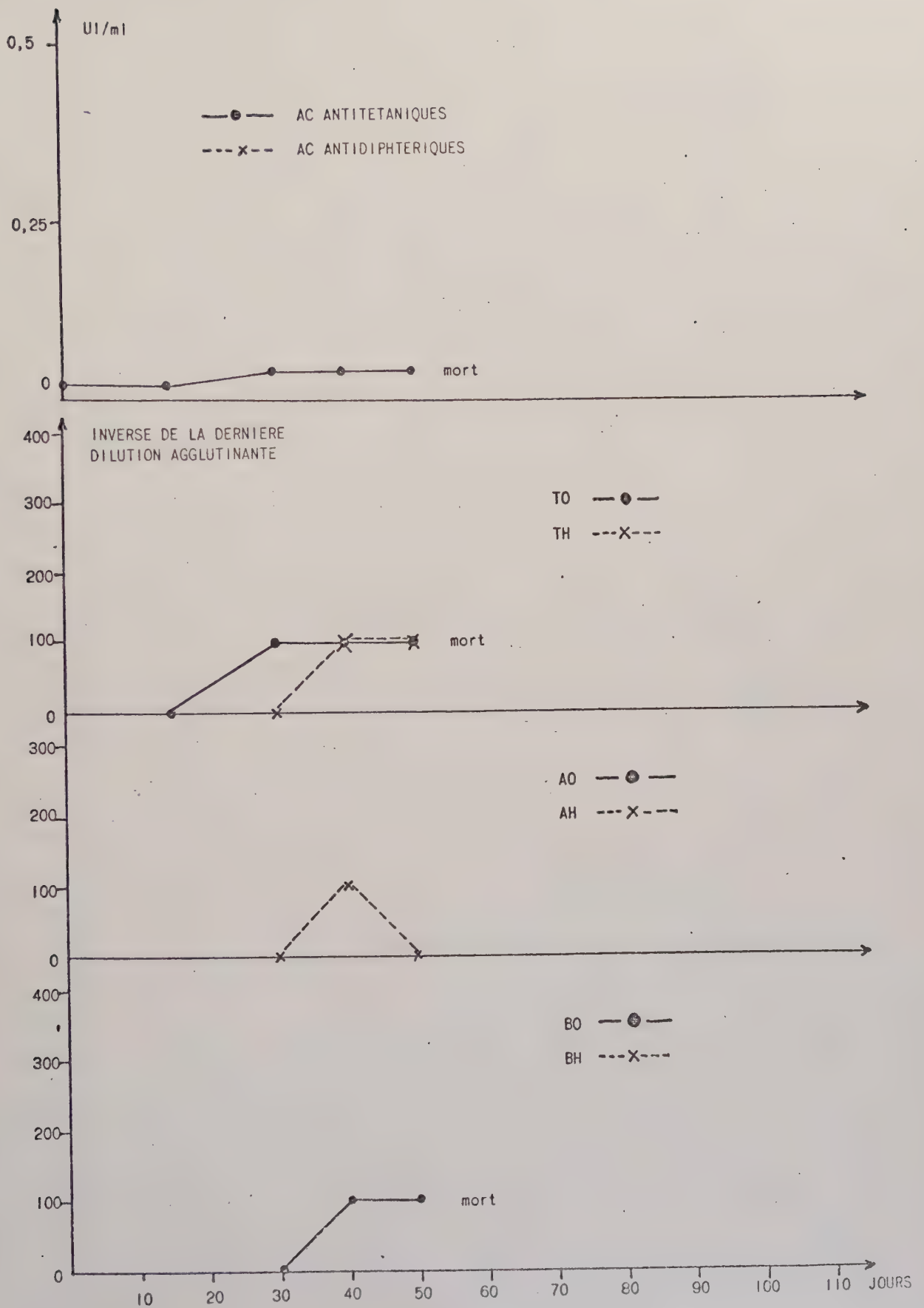
Graphe N° 28 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule III : BM - Lapin N° 768



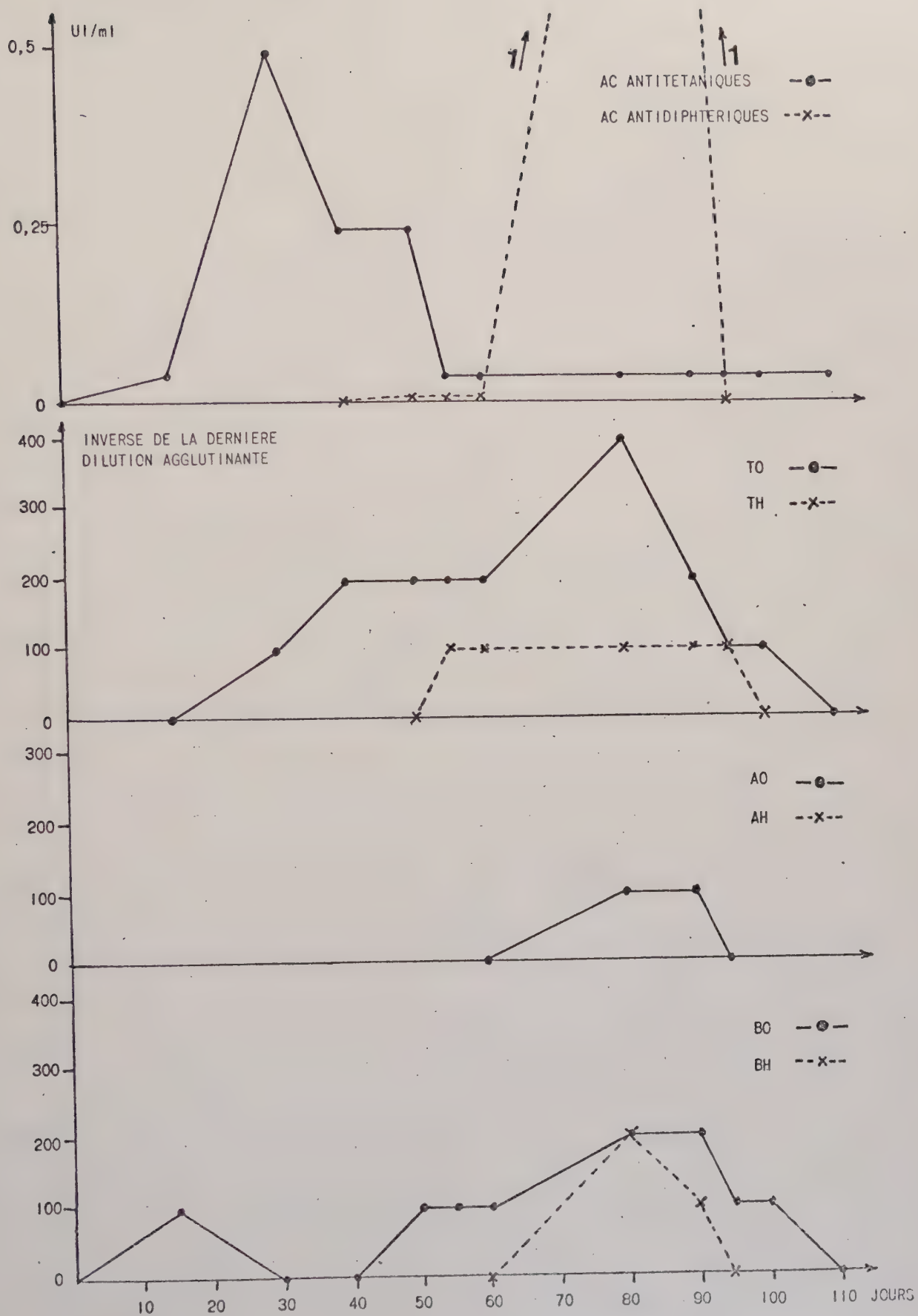
Graphe N° 29 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule III : BM - Lapin N° 769



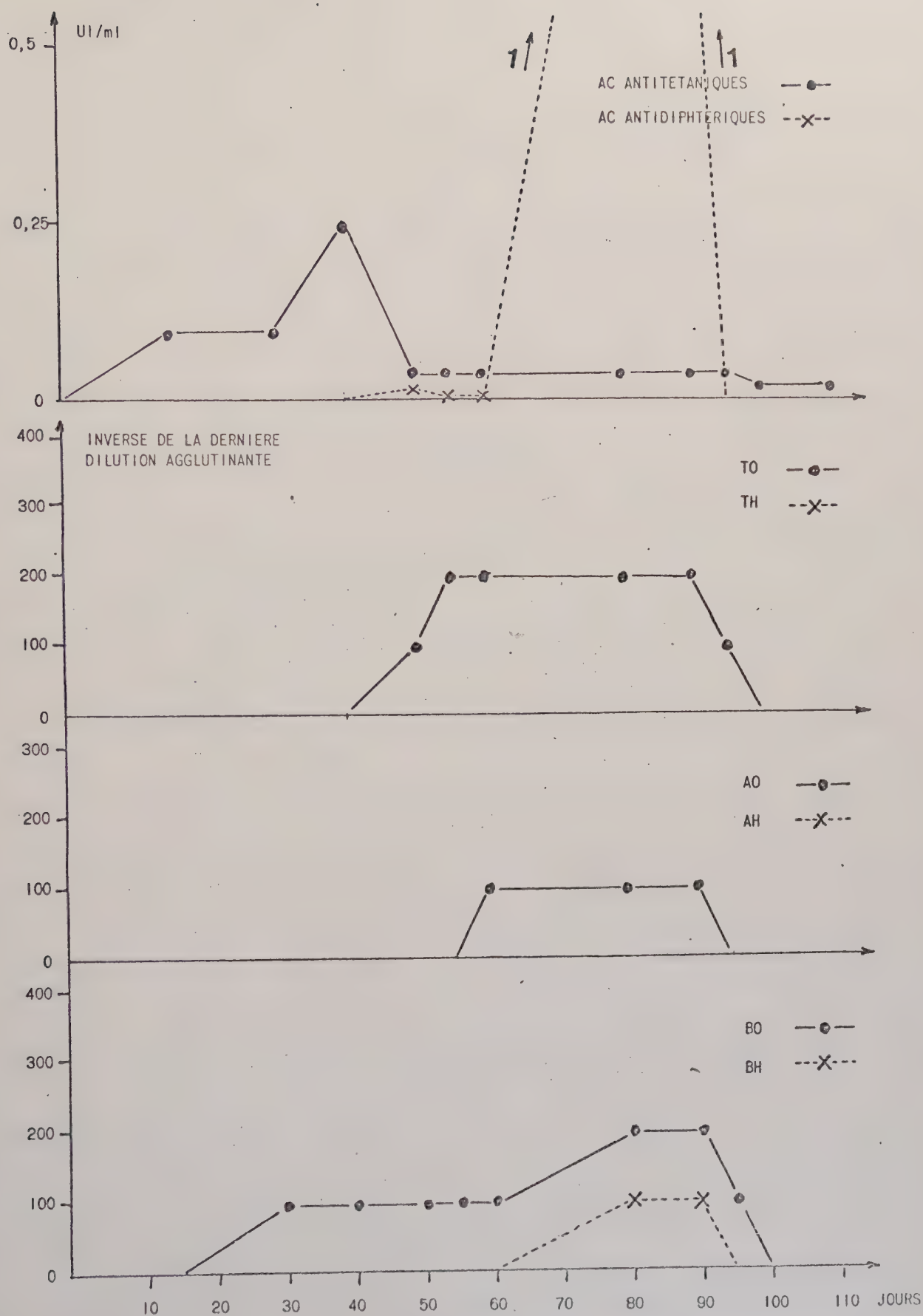
Graphe N° 30 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule III : BM - Lapin N° 770



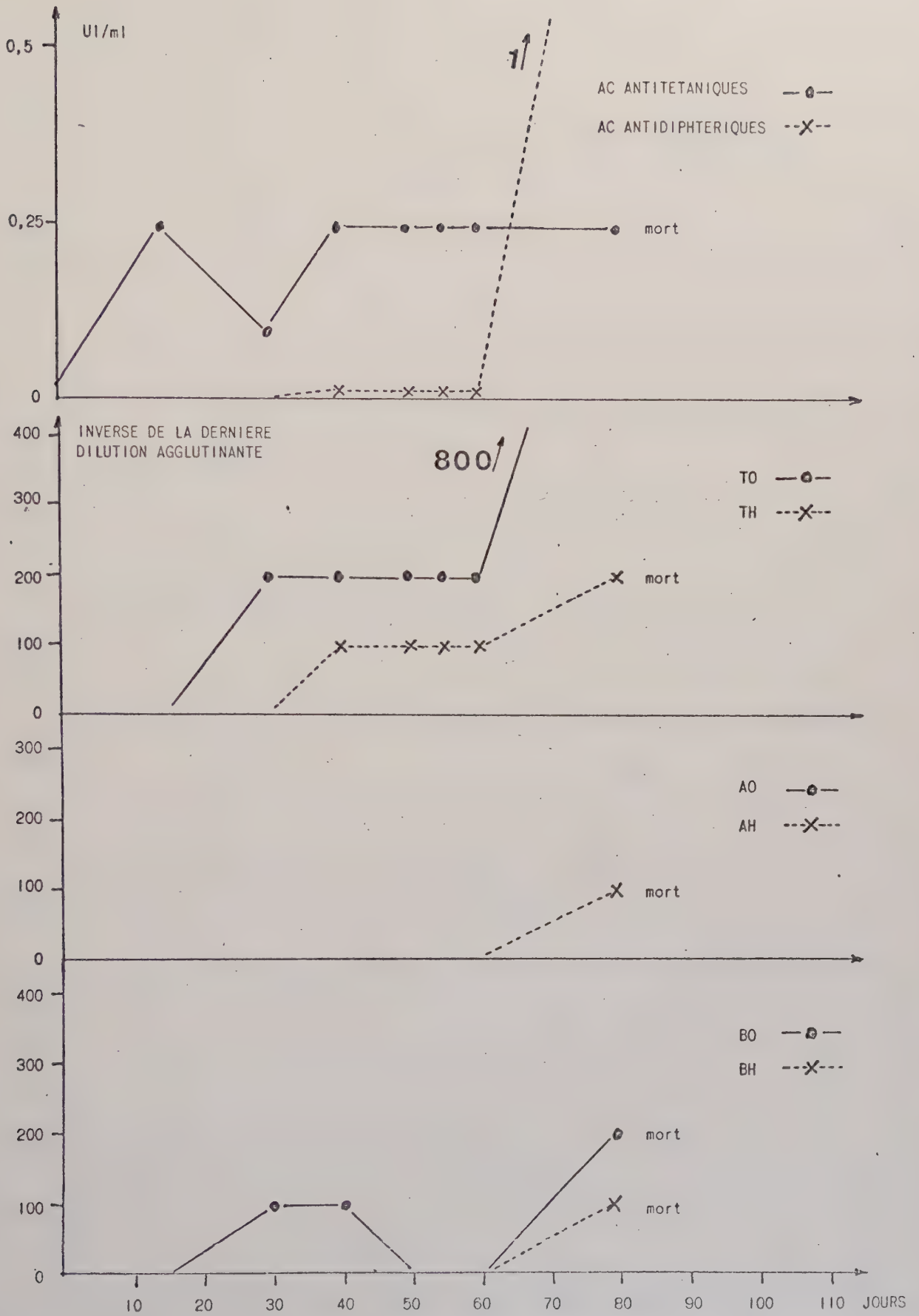
Graph 31 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 1



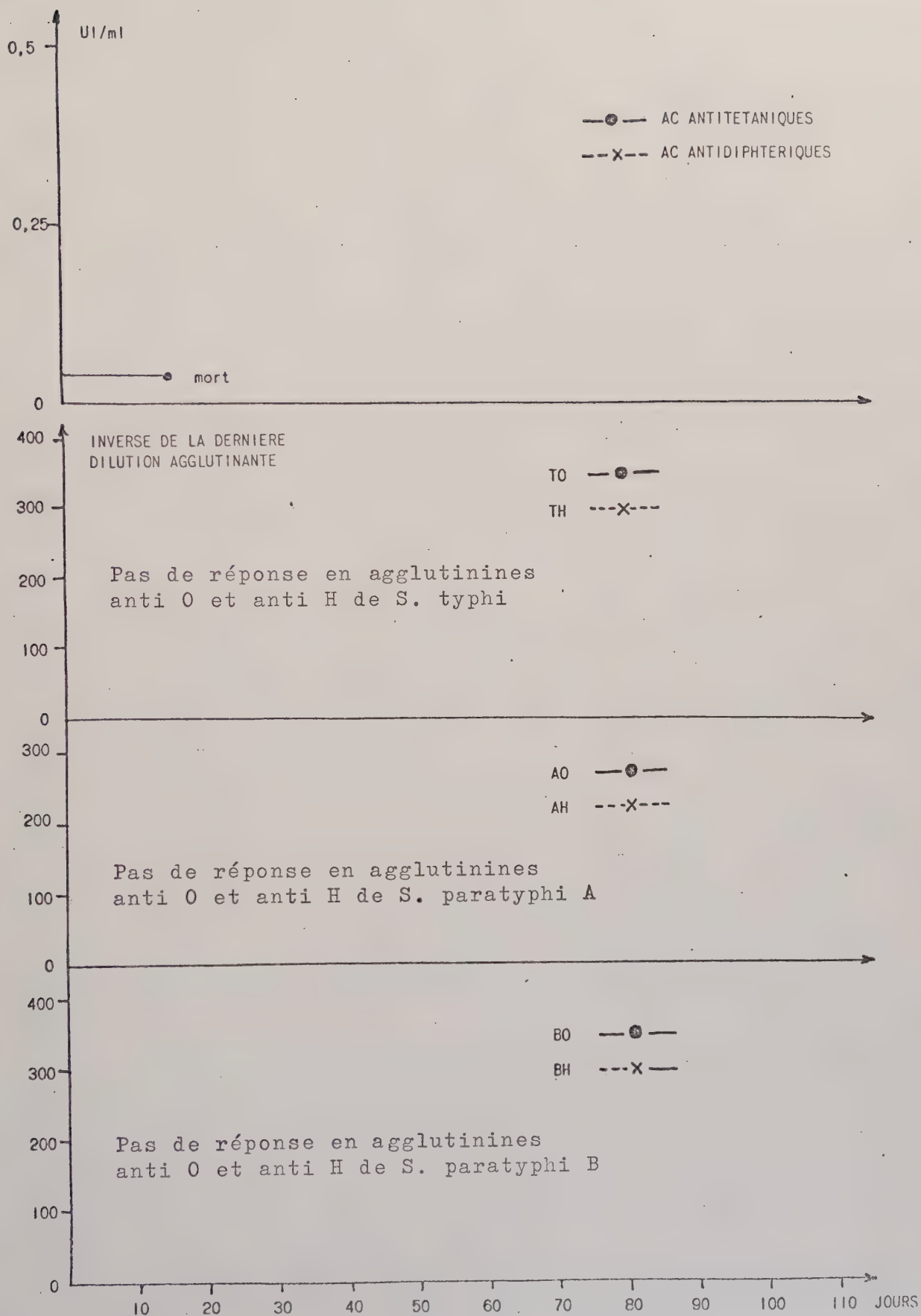
Graphe N° 32 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 2



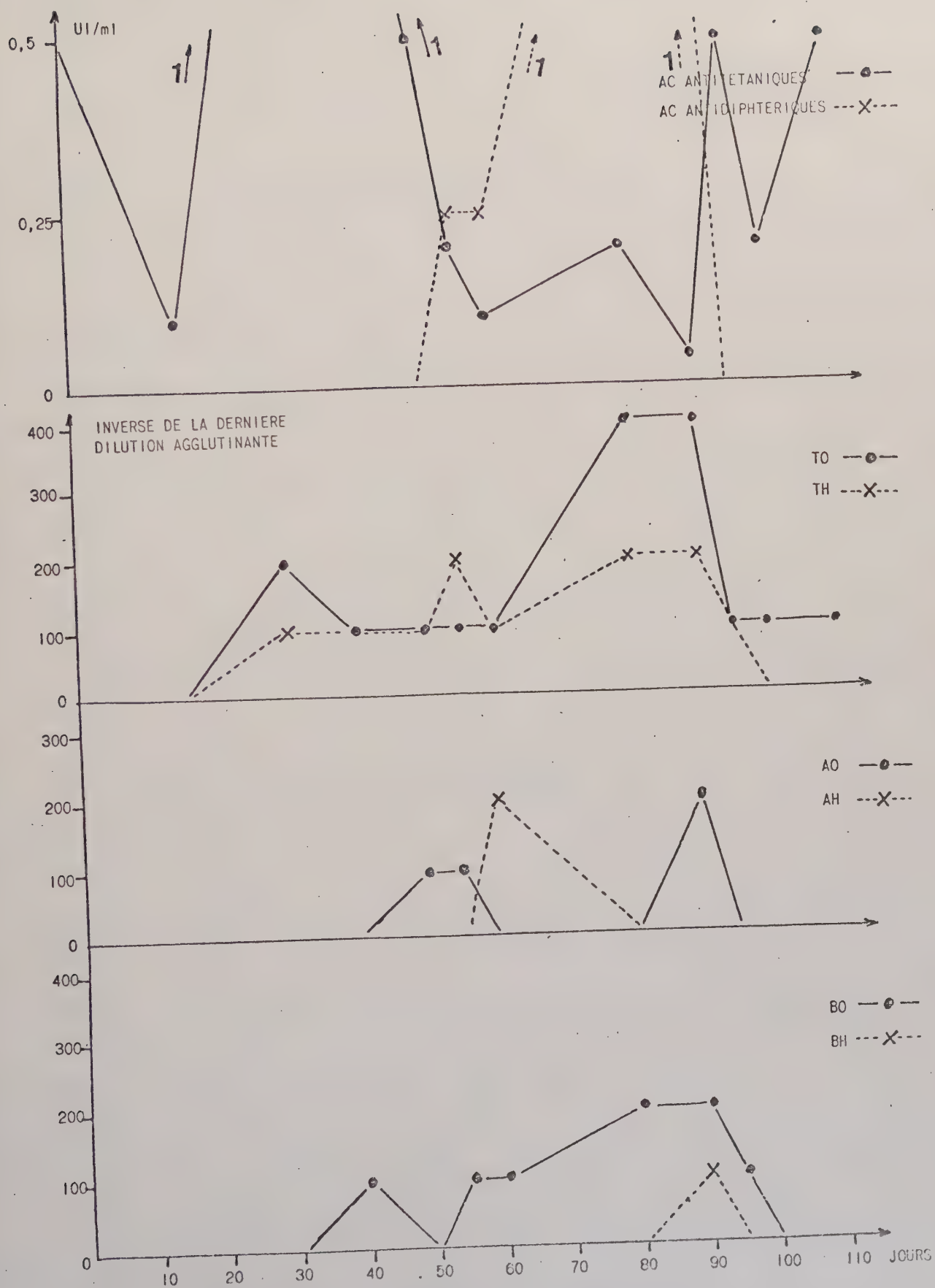
Graphe N° 33 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 3

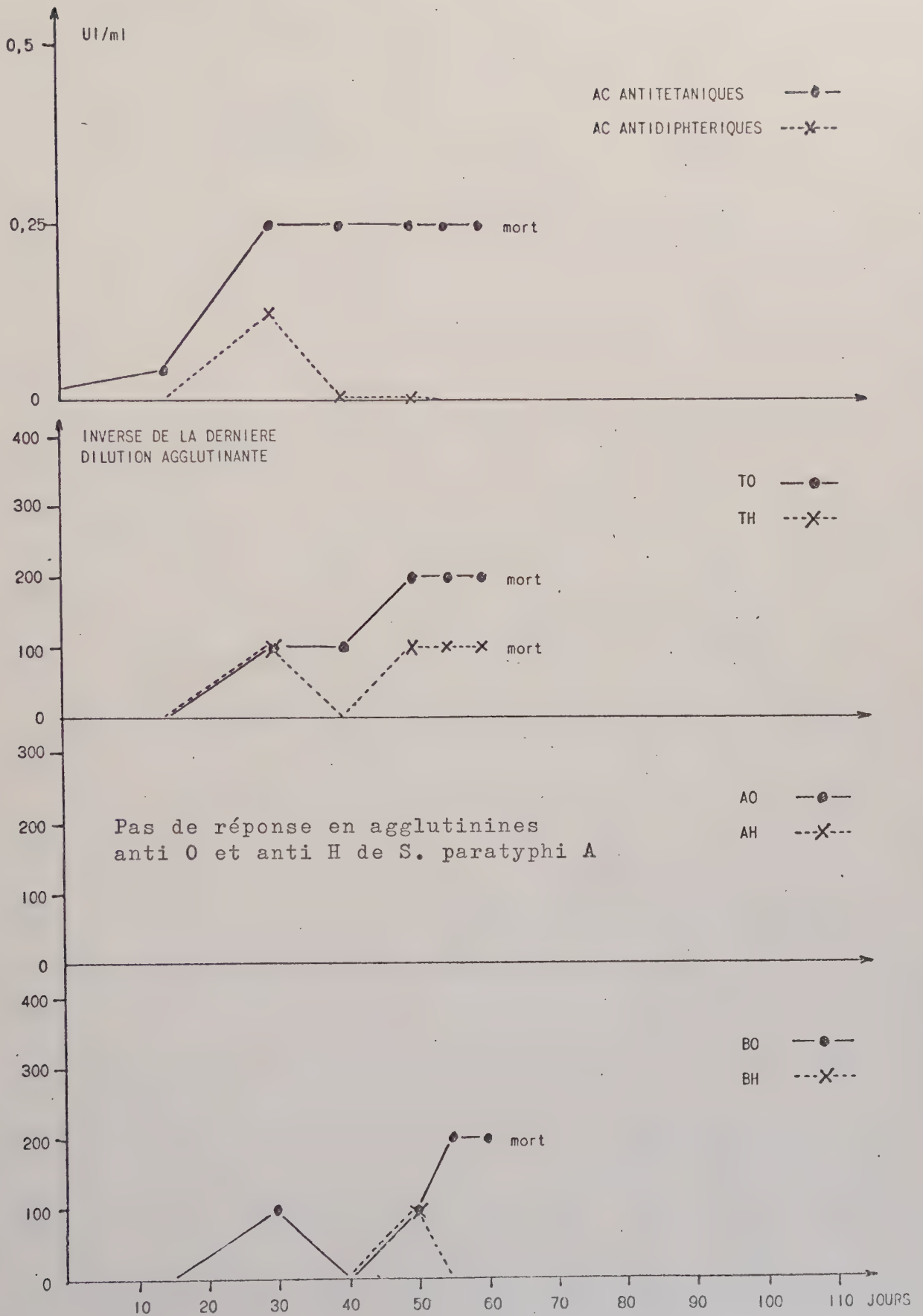


Graphes N° 34 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 4

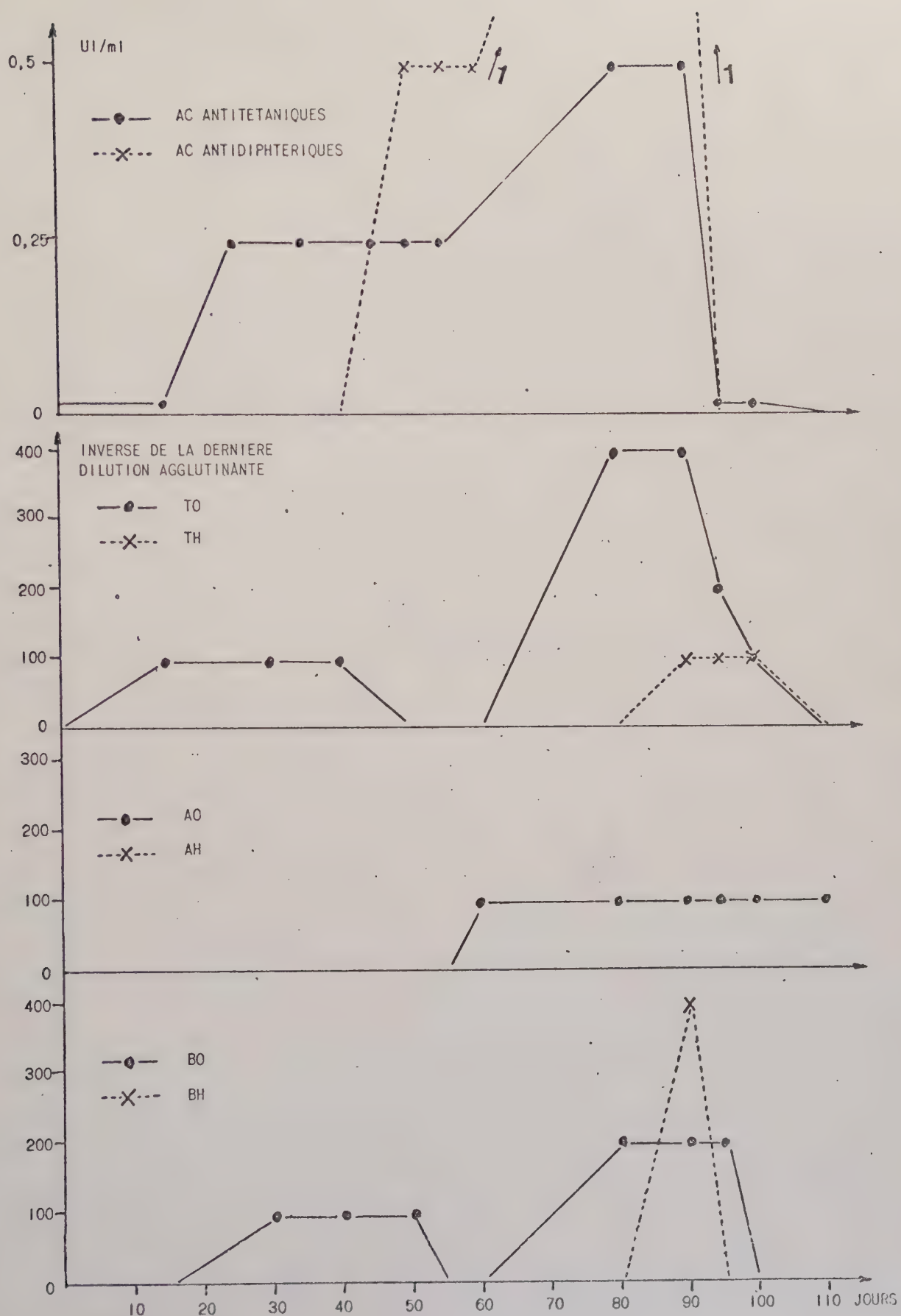


Graphe N° 35 : COURBES D'IMMUNISATION
Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 5



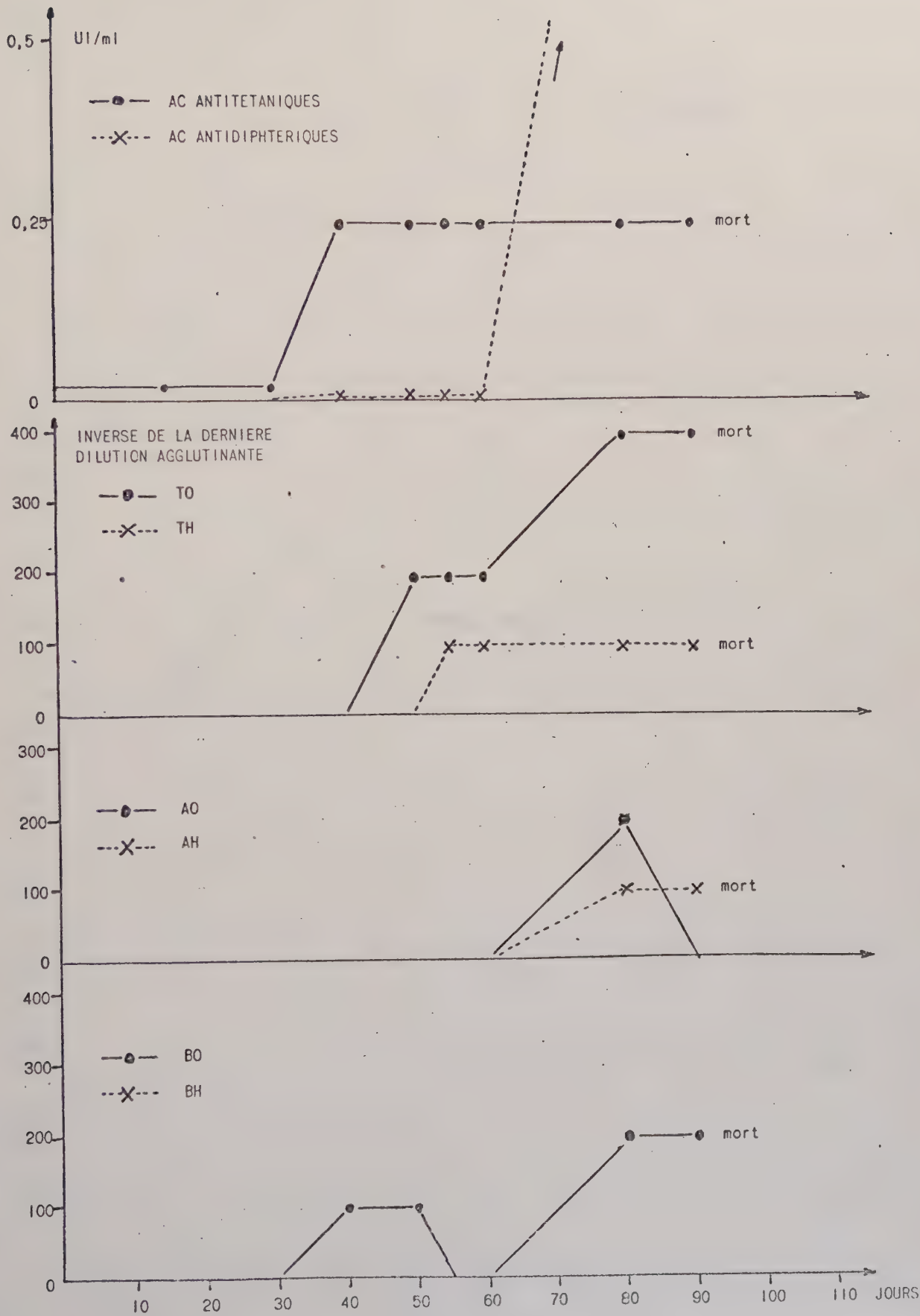
Graphe N° 36 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 6



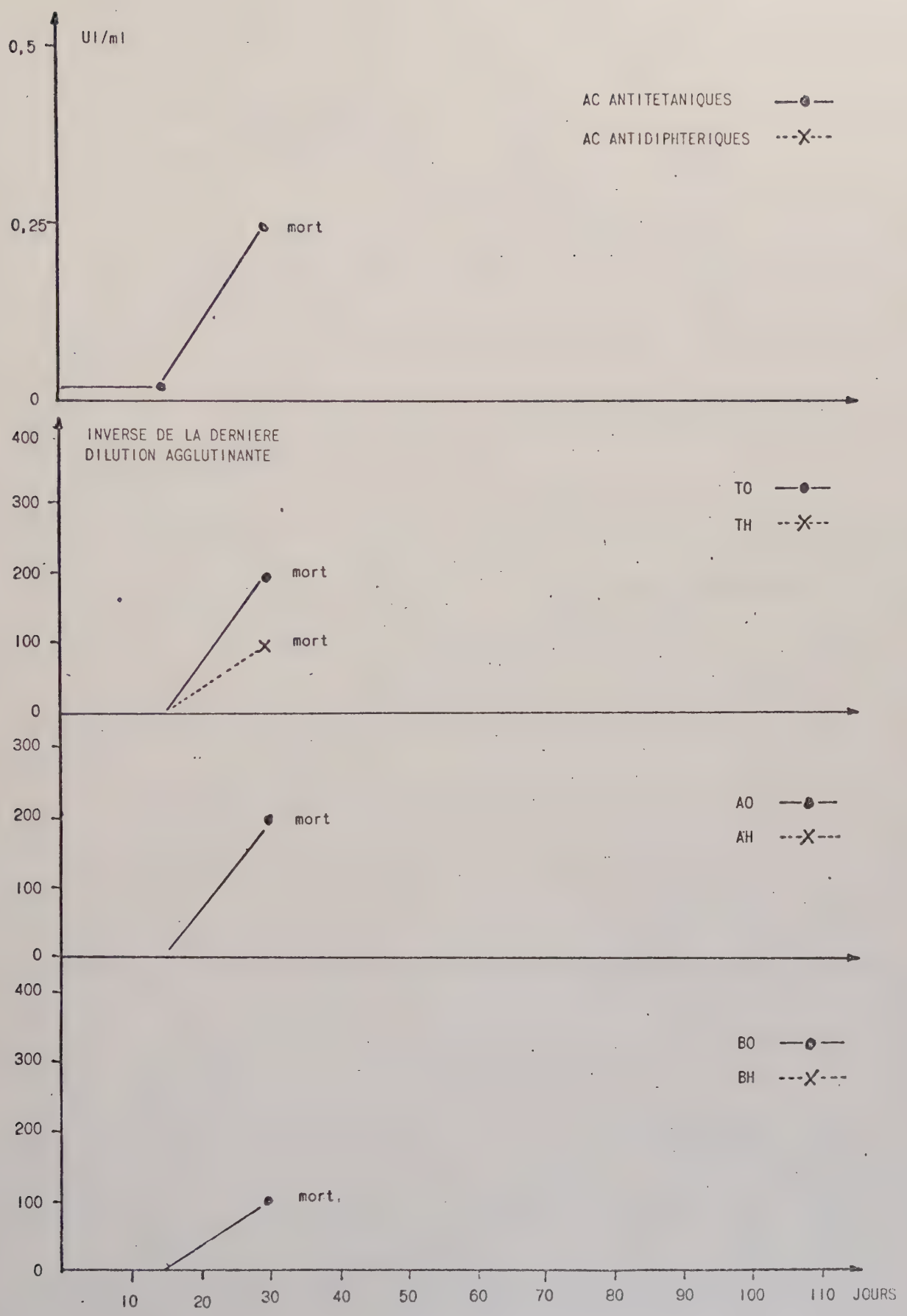
Graphe N° 37 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 7



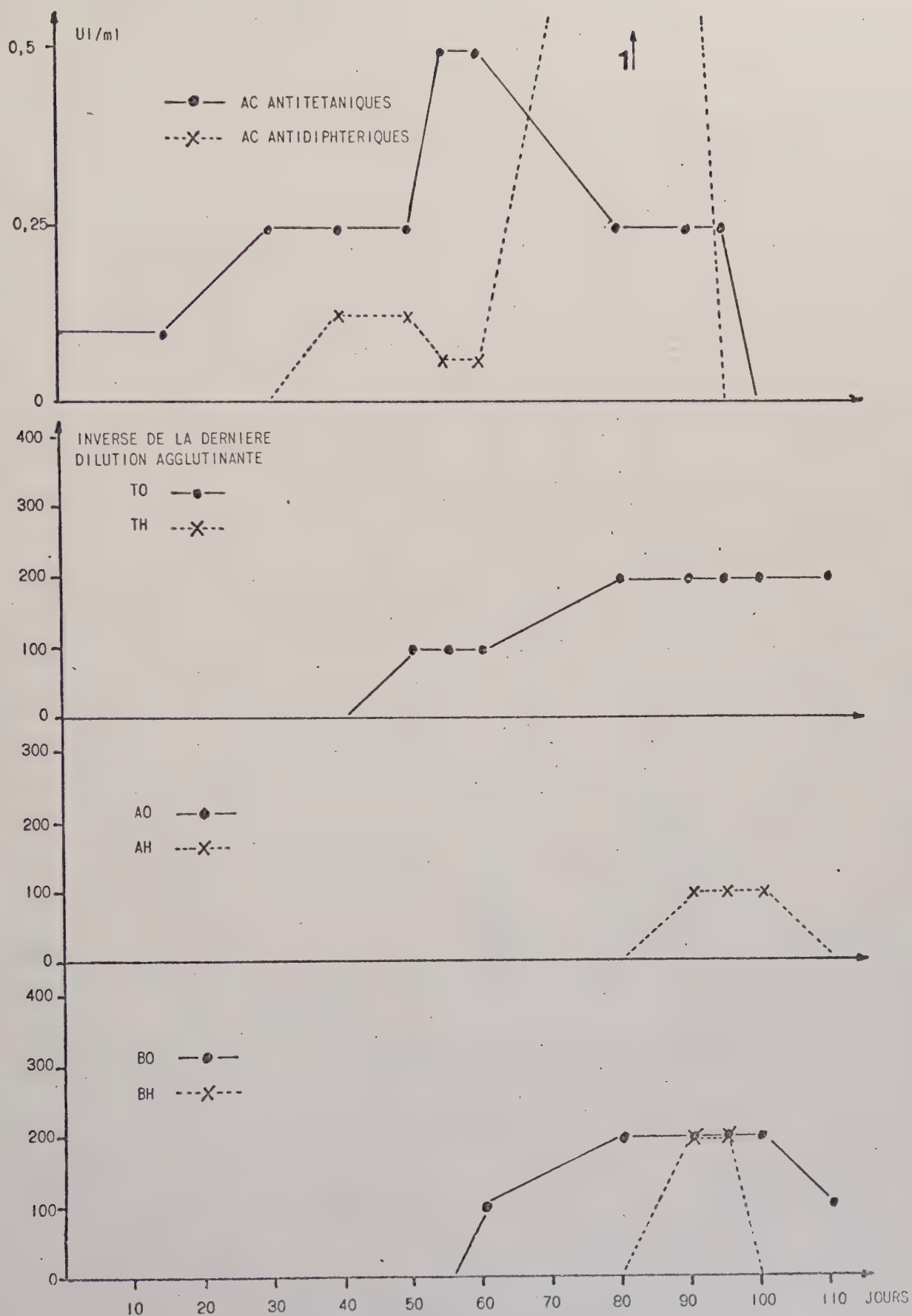
Graphique N° 38 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 8



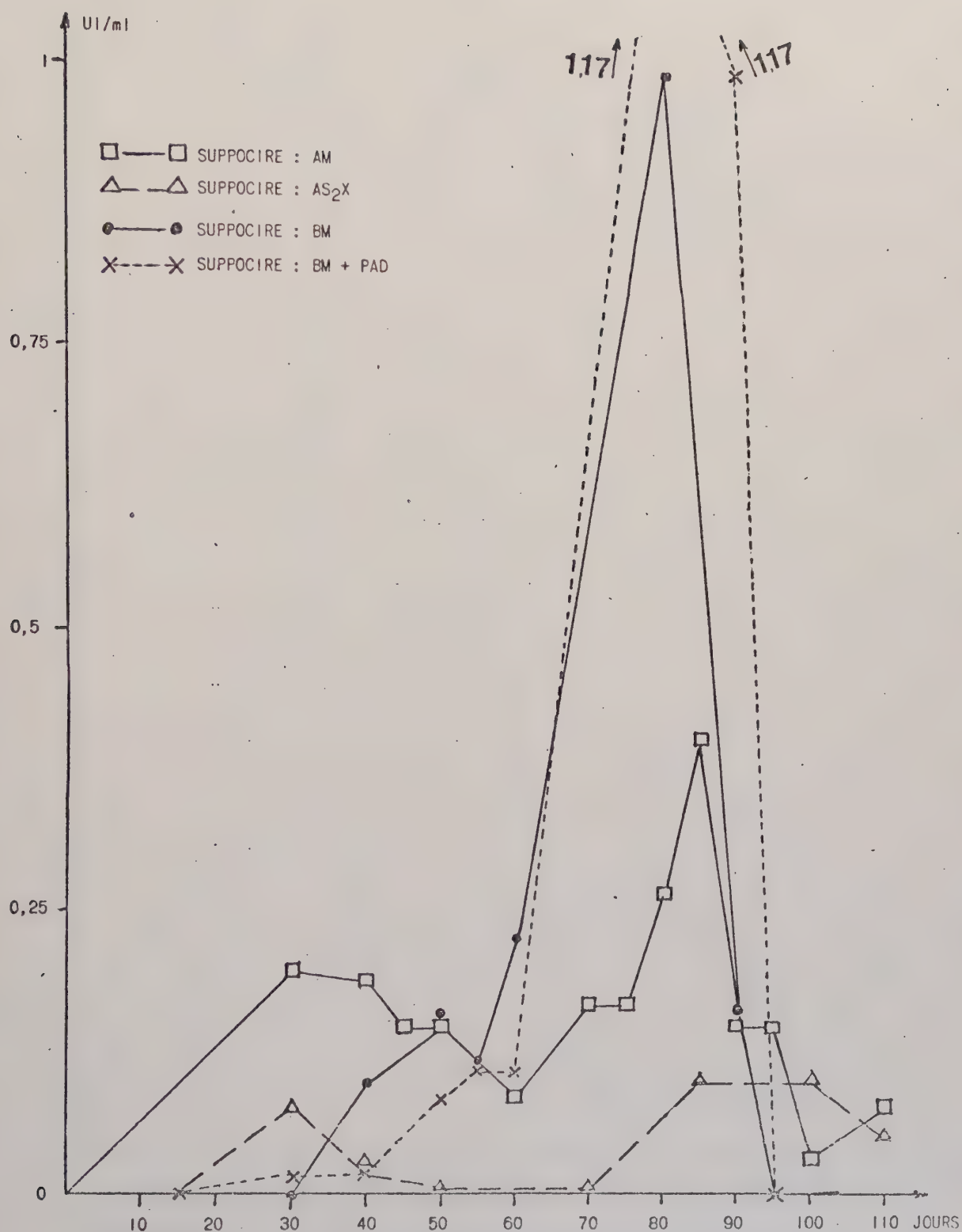
Graphe N° 39 : COURBES D'IMMUNISATION

Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 9

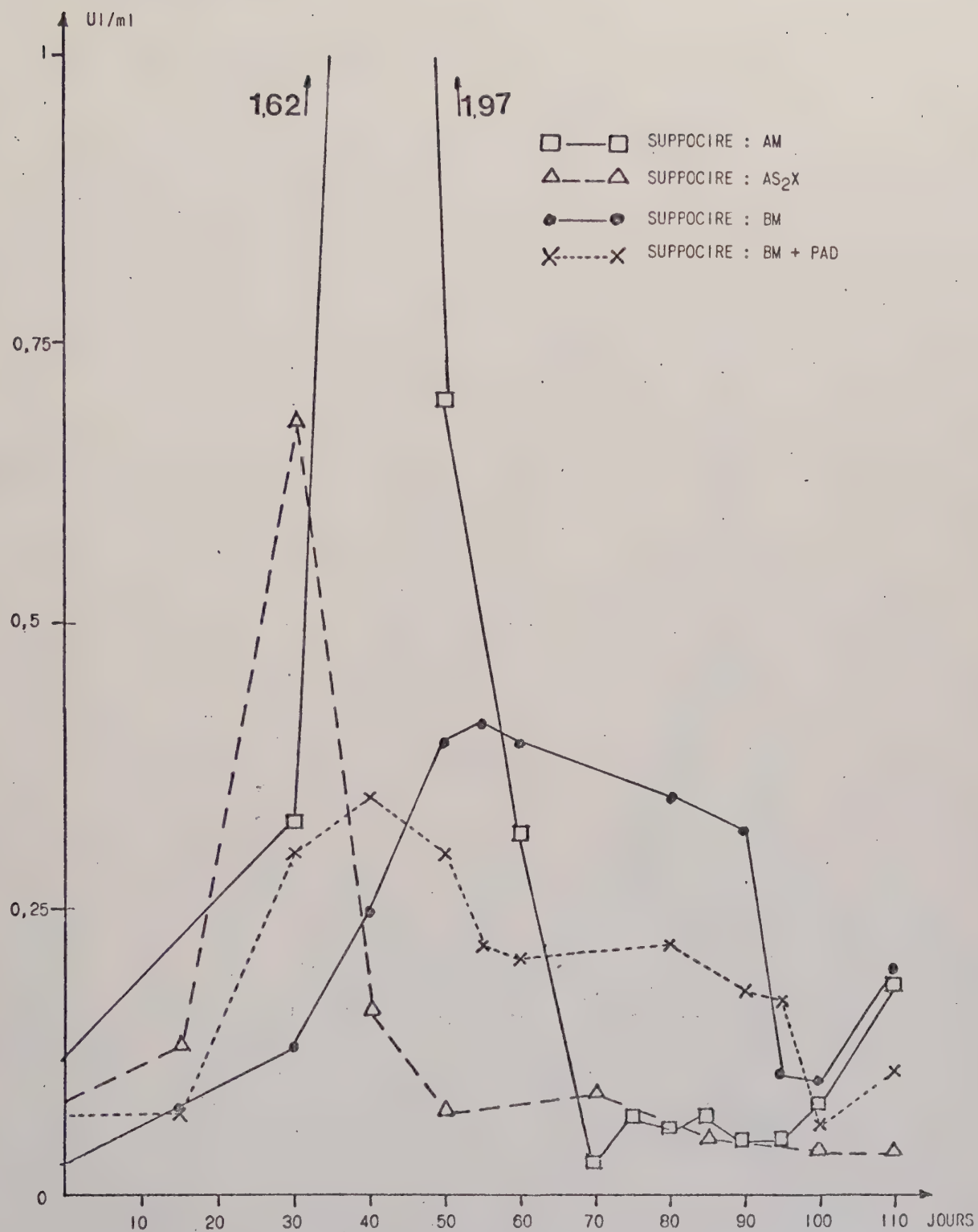


Graphe N° 40 : COURBES D'IMMUNISATION

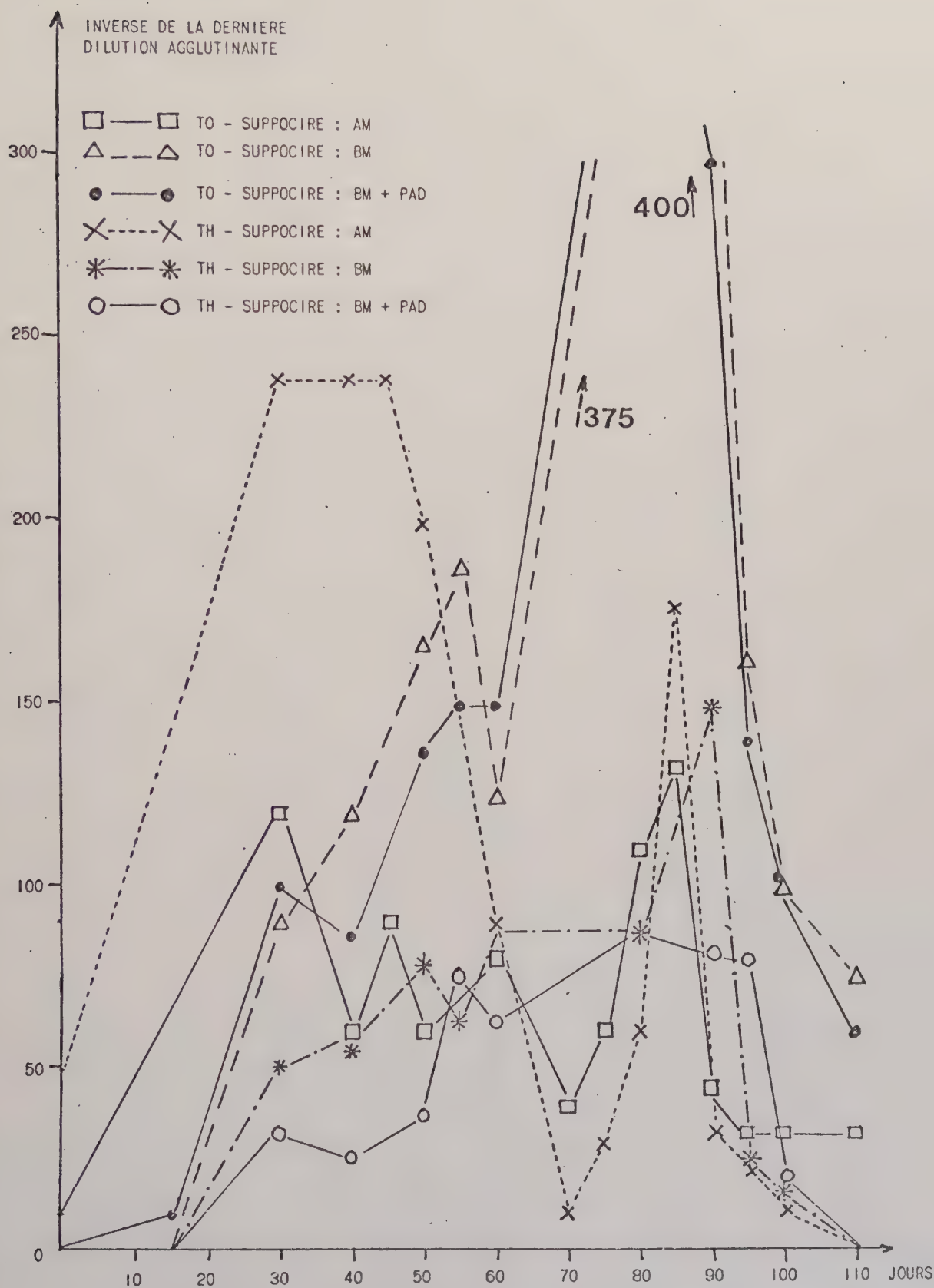
Formule IV : BM + PAD - Lapin N° 10



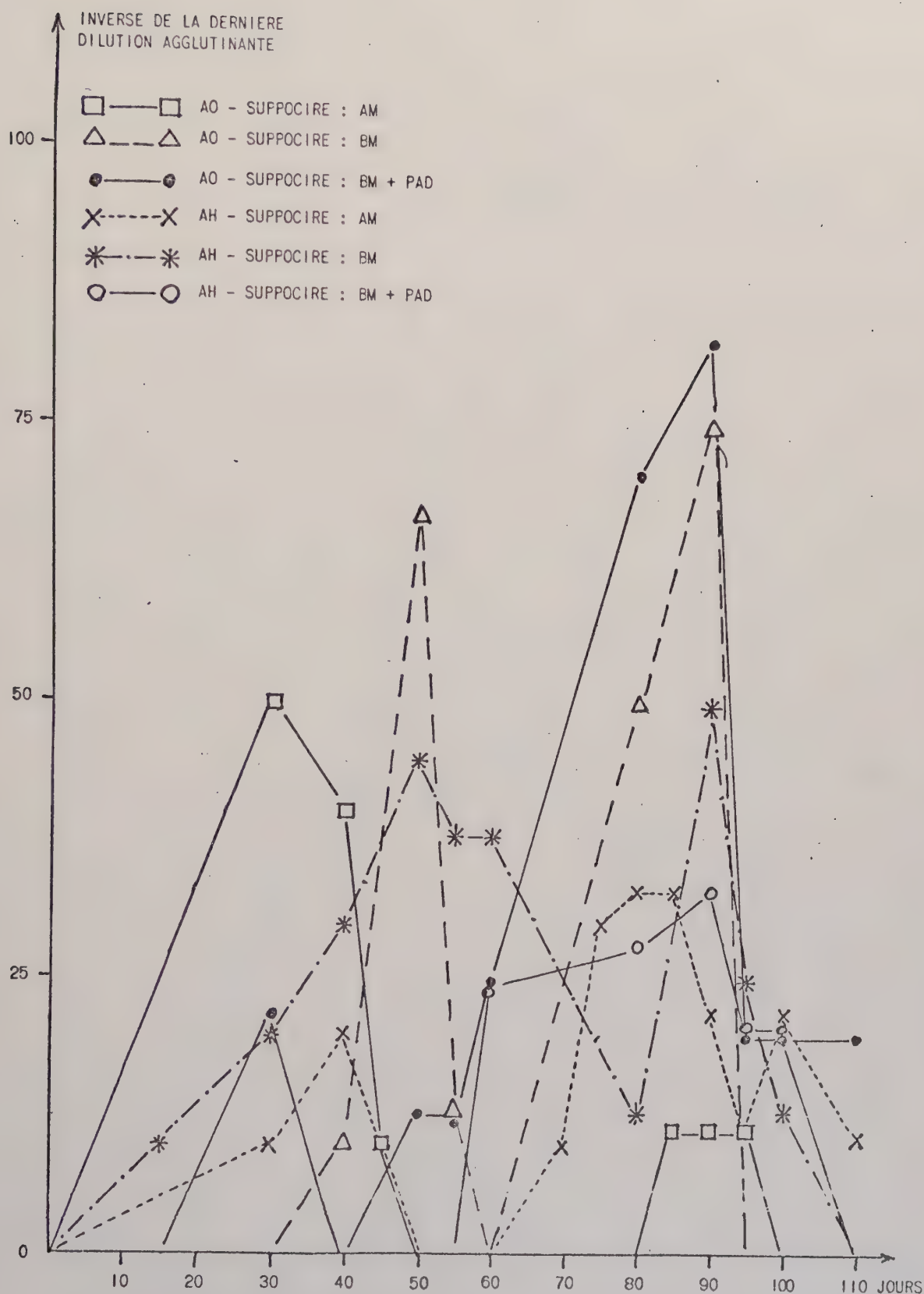
Graphe N° 41 : COURBES MOYENNES DES TAUX DES ANTICORPS ANTIDIPHTERIQUES OBTENUS AVEC LES DIFFERENTS EXCIPIENTS



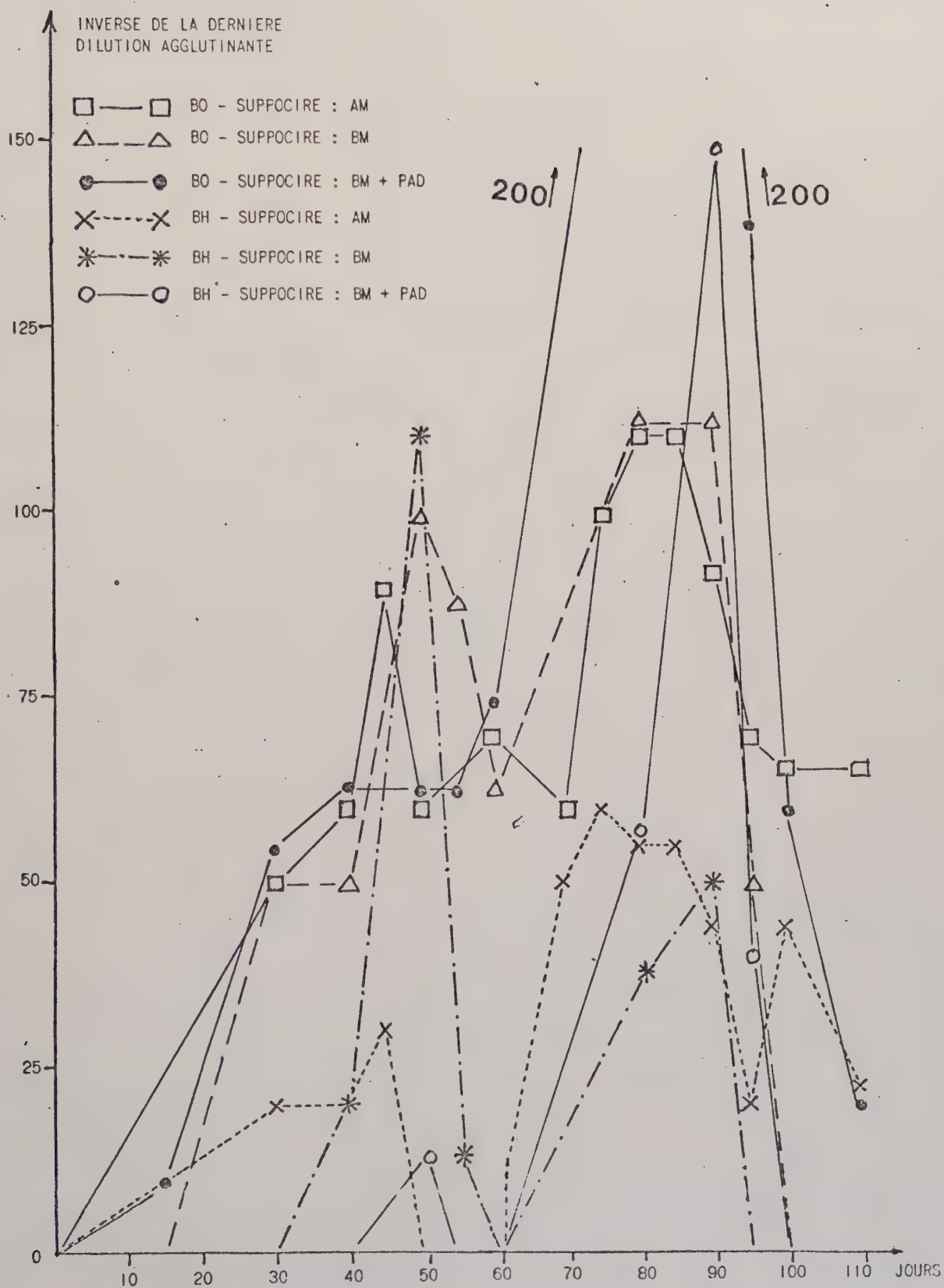
Graphe N° 42 : COURBES MOYENNES DES TAUX ANTICORPS
ANTITETANIQUEs OBTENUS AVEC LES
DIFFERENTS EXCIPIENTS



Graphique N° 43 : COURBES MOYENNES DES TAUX DES ANTICORPS
ANTI-SALMONELLA TYPHI OBTENUS AVEC LES
DIFFERENTS EXCIPIENTS



Graphes N° 44 : COURBES MOYENNES DES TAUX DES ANTICORPS
ANTI-SALMONELLA PARATYPHI A OBTENUS AVEC
LES DIFFERENTS EXCIPIENTS



Graphe N° 45 : COURBES MOYENNES DES TAUX DES ANTICORPS
ANTI-SALMONELLA PARATYPHI B AVEC LES
DIFFERENTS EXCIPIENTS

Cinquième Partie

ANALYSE DES RESULTATS ET DISCUSSION

1. - ANALYSE DES RESULTATS

Le but de ce paragraphe est l'analyse de l'ensemble des réponses obtenues avec chaque lot de lapins d'après les graphes N° 41 à 45. Vu l'hétérogénéité des résultats, surtout en ce qui concerne les anticorps anti-Salmonella typhi et paratyphi A et B, il nous a paru nécessaire de présenter un tableau récapitulatif pour chaque lot, tout en soulignant les points suivants :

- la date d'apparition des anticorps ;
- le taux moyen maximum des anticorps ;
- la qualité de la réponse :
- la durée de la réponse.

Notons tout d'abord que le taux d'anticorps anti-tétaniques $\leq 0,1$ que nous avons retrouvé chez certains lapins de chaque lot, avant toute immunisation, confirme l'existence chez le lapin d'une immunité naturelle liée à une immunisation spontanée par ingestion de spores tétaniques.

1.1. ANALYSE DES RESULTATS DU 1^{er} LOT DE LAPINS

- Formule I : Suppocire AM -

ANTICORPS	Date d'apparition	Taux moyen maximum	Qualité de la réponse	Durée
ANTIDIPHTERIQUES	J 30	< 0,5 UI/ml	hétérogène	30 jours
ANTITETANIQUES	J 30	1,97 UI/ml	homogène	30 jours
(O) ANTI-SALMONELLA TYPHI	J 30	< 150	hétérogène	10 jours
(H)	J 20	> 200	homogène	20 jours
(O) ANTI-SALMONELLA PARATYPHI A	J 30	< 50	hétérogène parfois nulle	10 jours
(H)	J 30	< 25	hétérogène parfois nulle	10 jours
(O) ANTI-SALMONELLA PARATYPHI B	J 35	> 100	hétérogène	30 jours
(H)	J 30	> 50	hétérogène	40 jours

L'étude du profil de la réponse immune de ce lot

montre :

- une régularité dans l'apparition des anticorps ;
- un taux moyen maximum élevé pour les anticorps antitétaniques le plus élevé des quatre lots ;
- une hétérogénéité de réponse concernant les anticorps anti-typhe et paratyphes A et B.

1.2. ANALYSE DES RESULTATS DU 2^{ème} LOT DE LAPINS

- Formule II : Suppocire AS₂X -

ANTICORPS	Date d'apparition	Taux moyen maximum	Qualité de la réponse	Durée
ANTIDIPHTERIQUES	J 35	<0,25 UI/ml	hétérogène	20 jours
ANTITETANIQUES	J 15	>0,5 UI/ml	homogène	30 jours

On ne présente pas ici les anticorps anti-Salmonella typhi et paratyphi A et B car aucun des 10 lapins de la série n'a répondu.

On remarque :

- un taux modeste concernant les anticorps antidiphtériques, le moins élevé des quatre lots.

1.3. ANALYSE DES RESULTATS DU 3^{ème} LOT DE LAPINS

- Formule III : Suppocire BM -

ANTICORPS	Date d'apparition	Taux moyen maximum	Qualité de la réponse	Durée
ANTIDIPHTERIQUES	J 40	1 UI/ml	homogène	40 jours
ANTITETANIQUES	J 15	<0,5 UI/ml	homogène	80 jours
(O) ANTI-SALMONELLA TYPHI	J 30	375	homogène	50 jours
(H)	J 30	150	hétérogène	50 jours
(O) ANTI-SALMONELLA PARATYPHI A	J 40	75	hétérogène	20 jours
(H)	J 15	< 50	hétérogène	60 jours
(O) ANTI-SALMONELLA PARATYPHI B	J 30	> 100	hétérogène	50 jours
(H)	J 40	> 100	hétérogène	20 jours

Pour ce lot de lapins, la réponse immune se caractérise par :

- un taux maximum d'anticorps antidiphtériques élevé ;
- un taux maximum moyen d'anticorps anti-Salmonella typhi TO élevé (antigène somatique) ;
- la durée des réponses est longue dans l'ensemble.

1.4. ANALYSE DES RESULTATS DU 4^{ème} LOT DE LAPINS

- Formule IV : Suppocire BM + PAD -

ANTICORPS	Date d'apparition	Taux moyen maximum	Qualité de la réponse	Durée
ANTIDIPHTERIQUES	J 30	1,7 UI/ml	homogène	60 jours
ANTITETANIQUES	J 15	<0,5 UI/ml	homogène	60 jours
(O) ANTI-SALMONELLA TYPHI	J 15	400	homogène	60 jours
(H)	J 30	<100	hétérogène	50 jours
(O) ANTI-SALMONELLA PARATYPHI A	J 30	> 75	hétérogène	20 jours
(H)	J 15	< 50	homogène	60 jours
(O) ANTI-SALMONELLA PARATYPHI B	J 15	200	homogène	60 jours
(H)	J 50	< 25	hétérogène	10 jours

On remarque avec ce lot :

- un taux moyen maximum élevé des anticorps antidiphtériques = 1,7, le plus élevé des quatre lots ;
- un taux moyen maximum d'anticorps anti-Salmonella typhi (T0) (antigène somatique) ;
- la durée de la réponse est la plus longue de tous les lots.

2. - INTERPRETATION STATISTIQUE DES RESULTATS

Le plan expérimental retenu permet d'envisager l'exploitation des résultats par des techniques relevant de l'analyse de la variance (86). Les plans développés par WINER (58, 102) dans son ouvrage permettent de traiter le cas où les sujets sont répartis en plusieurs groupes (correspondant aux excipients dans notre cas) lorsque des mesures répétées (ici, jours) ont été effectuées sur le même élément.

Sous réserve que les variables mesurées suivent une loi normale^(*), cette méthode permet d'estimer :

- la variabilité due à l'effet jours par rapport à la variabilité entre les animaux ;
- la variabilité due aux jours ;
- ainsi qu'une éventuelle interaction entre les jours et les groupes excipients.

Le traitement de ces plans ne peut être effectué que si l'ensemble des données a été recueilli pour chaque unité expérimentale. Cela nous a contraint à limiter le nombre des animaux à 8 par groupe et le nombre de jours à 7 (dans notre cas, 7 prélèvements) de manière à obtenir des tableaux complets.

Bien qu'un examen rapide des données nous incline à émettre l'opinion que leur variabilité soit relativement éloignée de la loi normale^(*), nous avons pensé que l'élaboration d'un tel traitement statistique n'était pas dépourvue

(*) Cet aspect de la question qui sera discuté ultérieurement nous a conduit à écarter du traitement statistique les variables TH, AO, AH, pour lesquelles nous avons obtenu un nombre insuffisant de réponses positives.

d'intérêt ; l'analyse de la variance étant par ailleurs un test robuste susceptible de supporter des écarts de données par rapport aux hypothèses retenues pour l'élaboration de modèles.

L'essentiel des résultats obtenus est présenté dans le tableau N° 50 qui donne les moyennes journalières pour chacune des variables retenues et dans le tableau N° 51 qui permet de mettre en évidence les interactions éventuelles entre les groupes et les jours.

Par ailleurs, d'après l'examen des résultats des 5 tableaux N° 52, 53, 54, 55 et 56 correspondant à chaque variable (TO, BO, BH, ATT, AD), il ressort que les différences entre les traitements sont généralement significatives pour les variables 1, 2 et 4. Cet effet s'explique notamment par le fait que le traitement N° 2 est inefficace (suppocire AS_2X).

L'effet jour est également significatif pour l'ensemble des 5 variables. Il nous a paru intéressant de compléter cette analyse par l'étude des régressions polynomiales qui nous a permis de mettre en évidence une tendance linéaire pour les variables 1, 2, 3 et 5, et une tendance quadratique pour la variable 4.

La tendance linéaire n'est autre chose que la mise en évidence du développement de l'immunisation au cours des 7 prélèvements. La tendance quadratique permet de mettre en évidence deux phases qui correspondent au passage du taux d'anticorps de la variable 4 par un maximum situé approximativement vers le troisième et quatrième prélèvement (voir les 5 tableaux N° 57, 58, 59, 60 et 61 correspondant aux numéros d'analyses).

Les interactions traitements $\times$ jours sont significatives pour les variables 1, 3 et 4. Dans la plupart des cas, cette interaction résulte du fait que le deuxième traitement (supposons (AS_2X)) n'a pas d'effet et traduit par conséquent l'absence de parallélisme dans les tendances linéaires précédemment évoquées.

Ces résultats montrent l'intérêt que peut présenter une exploitation systématique des données recueillies. Dans l'éventualité d'une expérimentation portant sur des phénomènes immunologiques de même nature, il y aurait toutefois lieu de rechercher les raisons des écarts des variables retenues par rapport à la loi normale :

- soit pour dégager les causes de cette variabilité ;
- soit pour adopter ou rechercher une méthodologie applicable à ce type de données.

Certains résultats laissent à penser que le phénomène étudié revêt parfois une allure de tout ou rien qui ne peut être mise en évidence que sur des lots d'animaux plus importants.

- Tableau N° 50 -

MOYENNES JOURNALIERES DE CHACUNE DES VARIABLES

EFFET	1					2					3					4					5				
	TO					BO					BH					ATT					AD				
A																									
1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	1	0	2	0	1	0	7	5	1	0	3	1	3	0	1	7	7	0	8	5	0	0	1	0
3	0	3	0	3	0	4	0	3	7	5	0	2	5	0	5	7	9	1	0	8	5	0	0	3	2
4	0	4	0	4	0	4	0	3	3	0	3	1	3	0	3	7	8	3	0	7	6	0	0	7	6
5	0	5	0	5	0	5	0	5	3	0	5	2	5	0	5	3	6	1	0	1	2	0	0	1	2
6	0	6	0	6	0	6	0	6	3	0	6	2	5	0	6	2	5	1	0	8	5	0	0	8	5
7	0	7	0	7	0	6	0	6	3	0	6	5	3	0	6	5	1	6	1	4	0	0	1	4	4

INTERACTIONS EVENTUELLES GROUPES X JOURS

- VARIABLES -

3 3		1	2	3	4	5
		TO	BO	BH	ATT	AD
1	1	1.250	0.000	0.000	.132	0.000
2	1	12.500	6.250	1.250	.387	.125
3	1	7.500	7.500	2.500	1.938	.227
4	1	12.500	6.250	0.000	2.337	.141
5	1	5.000	6.750	0.000	.750	.183
6	1	12.500	11.250	3.750	.350	.111
7	1	5.000	12.500	7.500	.042	.218
8	2	0.000	0.000	0.000	.090	.003
9	2	0.000	0.000	0.000	.145	.003
10	2	0.000	0.000	0.000	.799	.096
11	2	0.000	0.000	0.000	.186	.017
12	2	0.000	0.000	0.000	.057	.003
13	2	0.000	0.000	0.000	.075	.003
14	2	0.000	0.000	0.000	.049	.127
15	3	0.000	0.000	0.000	.037	0.000
16	3	0.000	0.000	0.000	.091	0.000
17	3	8.750	5.000	0.000	.119	0.000
18	3	11.250	3.750	1.250	.264	.126
19	3	17.500	11.250	1.250	.381	.178
20	3	18.750	8.750	1.250	.355	.119
21	3	12.500	6.250	0.000	.344	.122
22	4	0.000	0.000	0.000	.085	0.000
23	4	1.250	1.250	0.000	.084	0.000
24	4	8.750	5.000	0.000	.309	.016
25	4	8.750	6.250	0.000	.344	.019
26	4	13.750	6.250	1.250	.255	.085
27	4	15.000	6.250	0.000	.222	.107
28	4	15.000	7.500	0.000	.210	.107

M = EXCIPIENTS - A = PRÉLÈVEMENTS

- Tableau N° 52 -

VARIABLE NO 1		TO			
SOURCE DE VARIATION		DOL	SCC.	VAR.	F.COL.
INTER S. M. RESIDU S.	LAPI	31	8898.214	237.039	5.875
	EXCI	3	3437.500	1145.233	
	LAPI	28	5460.714	195.025	
INTRA SA A MA RESIDU SA	JOUR	192	15257.143	79.464	7.895
		6	2717.857	452.475	
		18	2900.000	161.111	
		168	9639.286	57.377	

SIGN.

**

**

**

- Tableau N° 53 -

VARIABLE NO 2		BO			
SOURCE DE VARIATION		DOL	SCC.	VAR.	F.COL.
INTER S. M. RESIDU S.	LAPI	31	4895.714	157.604	4.728
	EXCI	3	1642.857	547.519	
	LAPI	28	3242.857	115.316	
INTRA SA A MA RESIDU SA	JOUR	192	6800.000	35.417	7.484
		6	1273.214	212.202	
		18	769.643	62.754	
		168	4757.143	21.315	

SIGN.

**

**

NS

SOURCE DE VARIATION				DDL	SCC.	VAR.	F.CAL.	
INTER	S.	LAPI		31	685.714	22.120		
	M.	EXCI		3	160.714	53.571		NS
RESIDU	S.	LAPI		28	525.000	18.750		
INTRA	SA			192	1400.000	7.222		
	.A	JOUR		6	79.464	13.244		*
	MA			18	320.536	17.808		***
RESIDU	SA			168	1000.000	5.952		

- Tableau N° 55 -

SOURCE DE VARIATION				DDL	SCC.	VAR.	F.CAL.	
INTER	S.	LAPI		31	32.380	1.045		
	M.	EXCI		3	16.892	5.631		***
RESIDU	S.	LAPI		28	15.487	.553		
INTRA	SA			192	114.522	.296		
	.A	JOUR		6	16.742	2.720		***
	MA			18	28.464	1.581		***
RESIDU	SA			168	69.316	.413		

VARIABLE NO		5	AD	SOURCE DE VARIATION		DDL	SCC.	VAR.	F _{0.01}	
INTER	S.			LAPI		31	3.602	.116		
M.				EXCI		3	.392	.131		
RESIDU	S.			LAPI		28	3.210	.115	1.141	NS
INTRA	SA					192	4.802	.025		
A				JOUR		6	.433	.073	3.071	**
MA						18	.377	.021	.003	NS
RESIDU	SA					168	3.987	.024		

SIGNIFICATION DES SOURCES DE VARIATIONS :

INTER S.	VARIABILITÉ ENTRE LES LAPINS
M.	VARIABILITÉ ENTRE LES TRAITEMENTS (EXCIPIENTS)
RESIDU S.	VARIABILITÉ RÉSIDUELLE INTRA-TRAITEMENT
INTRA .A.	VARIABILITÉ ENTRE LES JOURS
MA	INTERACTION TRAITEMENT X JOURS
RESIDU.SA	VARIABILITÉ RÉSIDUELLE LAPIN X JOURS

TABLEAU D'ANALYSE - VARIABLE N° 1 -

SOURCE DE VARIATION		DDL	SCC	VAR	F
EFFET ETUDIE	:	6.000	2111.851	452.916	1.894
TENDANCE					
-LINEAIRE	:	1.000	2064.285	2064.285	35.977
-QUADRATIQUE	:	1.000	500.595	500.595	8.724
-CUBIQUE	:	1.000	52.083	52.083	.907
-QUARTIQUE	:	1.000	50.730	50.730	.884
RESIDUELLE	:	168.000	9639.286	57.376	

-

- Tableau N° 58 -

TABLEAU D'ANALYSE - VARIABLE N° 2 -

SOURCE DE VARIATION		DDL	SCC	VAR	F
EFFET ETUDIE	:	6.000	1273.214	212.202	1.493
TENDANCE					
-LINEAIRE	:	1.000	1116.071	1116.071	39.414
-QUADRATIQUE	:	1.000	100.595	100.595	3.552
-CUBIQUE	:	1.000	.520	.52001	.183
-QUARTIQUE	:	1.000	3.429	3.429	.121
RESIDUELLE	:	168.000	4757.143	28.316	

- Tableau N° 59 -

TABLEAU D'ANALYSE - VARIABLE N° 3 -

SOURCE DE VARIATION		DDL	SCC	VAR	F
EFFET ETUDIE	:	6.000	79.464	13.244	2.225
TENDANCE					
-LINEAIRE	:	1.000	64.285	64.285	10.799
-QUADRATIQUE	:	1.000	7.291	7.291	1.225
-CUBIQUE	:	1.000	4.687	4.687	.787
-QUARTIQUE	:	1.000	.994	.994	.167
RESIDUELLE	:	168.000	1000	5.952	

- Tableau N° 60 -

TABLEAU D'ANALYSE - VARIABLE N° 4 -

SOURCE DE VARIATION		DDL	SCC	VAR	F
EFFET ETUDIE	:	6.000	16.142	2.790	6.762
TENDANCE					
-LINEAIRE	:	1.000&01	.036&01	.036&01	.089
-QUADRATIQUE	:	1.000	10.901	10.901	26.421
-CUBIQUE	:	1.000	.990	.990	2.400
-QUARTIQUE	:	1.000	2.687	2.687	6.514
RESIDUELLE	:	168.000	69.316	.412	

- Tableau N° 61 -

TABLEAU D'ANALYSE - VARIABLE N° 5 -

SOURCE DE VARIATION		DDL	SCC	VAR	F
EFFET ETUDIE	:	6.000	.437	.072	3.075
TENDANCE					
-LINEAIRE	:	1.000	.362	.362	15.270
-QUADRATIQUE	:	1.000&01	.113&01	.113	.477
-CUBIQUE	:	1.000	.020	.020	.877
-QUARTIQUE	:	1.000&01	.148&01	.148	.626
RESIDUELLE	:	168.000	3.987&01	.237	

3. - D I S C U S S I O N

La variété des réponses immunes selon les excipients et selon les antigènes est le caractère marquant de notre expérimentation. Nous allons donc essayer de rechercher les raisons de cette différence et voir dans quelles mesures certains facteurs ont pu intervenir et influencer ainsi nos résultats. Dans notre cas, on peut envisager deux sortes de facteurs :

- 1) Les facteurs biogaléniques comprenant l'ensemble des paramètres liés aux principes actifs, à leur libération et à leur absorption par la muqueuse rectale, d'autres sont liés à la nature des excipients et d'autres, enfin, aux interactions principes actifs/excipient et principes actifs/principes actifs.
- 2) Les facteurs immunologiques comprennent la recherche des rapports existant entre la qualité des réponses immunes obtenues, leur intensité et le rôle de l'adjuvant de l'immunité que nous avons utilisé (Principe Actif Ducton), ainsi que l'incidence des excipients sur le développement de cette immunité.

Mais avant de se pencher sur l'examen de ces différents facteurs, nous avons jugé indispensable de décrire brièvement les phénomènes de l'absorption rectale : la structure générale de la membrane cellulaire chez l'animal est conforme au modèle d'unités de membrane où deux rangées de phospholipides se trouvent entre deux couches de protéines en formant ainsi une barrière de lipoïdes. La membrane entière peut être composée d'une, de deux ou de

plusieurs de ces unités de membrane. Une substance médicamenteuse peut traverser une membrane biologique selon quatre processus classiques :

- la diffusion passive,
- la convection,
- le transport actif,
- et la pinocytose.

Les différents mécanismes d'absorption des substances antigéniques au niveau de la muqueuse rectale conditionnent la manière dont la réponse immune s'établira, soit qu'elle demeure locale, soit qu'elle s'étende et devienne une réponse d'ordre général.

Dans notre cas, on peut formuler deux hypothèses :

- étant donné les caractères moléculaires des deux anatoxines diphtérique et tétanique, leur absorption peut se faire selon les quatre processus cités ci-dessus ;
- en raison du caractère particulière des antigènes typhiques et paratyphiques A et B, la pinocytose, très comparable à la phagocytose, paraît être le seul processus d'absorption : en effet, les macrophages accompagnant les cellules lymphocytaires vont à la rencontre des particules antigéniques dans la lumière du rectum et les ramènent à l'intérieur de la muqueuse, au contact des lymphocytes qui vont déclencher la réaction immunitaire. Leur rôle n'est d'ailleurs pas simplement de transport, mais également de dosage et de présentation du matériel antigénique, d'après FAUVE (32).

Les caractéristiques de chaque processus d'absorption ainsi que quelques exemples de substances médicamenteuses sont cités au tableau N° 62, d'après RITSCHER (82).

- Tableau N° 62 -

- MECANISMES D'ABSORPTION -

MECANISMES D'ABSORPTION	CARACTERISTIQUES	EXEMPLES
Diffusion passive	pKa de la substance coefficient de distribution lipoïde/eau pH extérieur et intérieur de la membrane gradient de concentration surface absorbante (étendue) et épaisseur de la membrane coefficient de diffusion	Acides organiques faibles Bases organiques faibles Non-électrolytes organiques : alcool, urée, amidopyrine glycosides cardiaques
Convection	Diamètre des pores = 7 Å Migration du solvant Différence de pression hydrostatique surface absorbante (étendue) et épaisseur de la membrane nombre de pores Résistance spécifique (viscosité) Charge électrique	Electrolytes inorganiques et organiques Ions de charge opposée au revêtement de pores sulfonamides ionisées
Transport actif	porteurs contre le gradient de concentration contre le potentiel électrochimique spécificité de saturation de transport Inhibition compétitive Empoisonnement du porteur	Na ⁺ , K ⁺ , I ⁻ , hexoses, monosaccharures, amino-acides, acides organiques forts, bases organiques fortes (phénol rouge), phosphates organiques glycosides cardiaques bases pyrimidiques, vitamines B, testostérone, oestradiol, 5-fluorouracil Fe ⁺⁺ , Ca ⁺⁺
Pinocytose	Vésicules englobantes	graisses, glycérine, amidon, oeufs de parasites vitamines A, D, E et K particules plastiques poils, cellules de levure Ferritine et insuline chez les jeunes enfants

La condition préalable à l'absorption est que le principe actif soit libéré de sa forme galénique.

Cependant, un médicament libéré n'est pas obligatoirement absorbé. Quand la molécule de médicament est fixée à la surface de la muqueuse rectale par liaison d'ions ou d'hydrogène, ou par les forces de Van der Waals, on obtient alors une absorption. Quand elle atteint une couche plus profonde de la muqueuse, on parle de pénétration, et ce n'est que quand la substance traverse les parois capillaires et pénètre dans le circuit sanguin qu'il s'agit d'adsorption.

On voit donc se dessiner trois phases essentielles au cours de l'absorption d'une substance administrée par voie rectale. :

- la première phase est la phase de libération des principes actifs :
- la deuxième phase est la phase de dissolution éventuelle de ces principes actifs ;
- et la troisième phase est la phase de l'absorption proprement dite.

Les facteurs biogaléniques vont influencer le déroulement de ces phases.

3.1. LES FACTEURS BIOGALENINIQUES -

Nous pouvons distinguer deux types de facteurs :

- 1) Les facteurs liés à la fusion des suppositoires.
- 2) Les facteurs liés à la formulation. :
 - les facteurs liés aux principes actifs,
 - les facteurs liés à l'excipient,
 - les facteurs liés aux interactions excipient/
principe actif et principe actif/principe actif.

3.1.1. Facteurs liés à la fusion des suppositoires :

La fusion des suppositoires est fondamentale dans le cas de suppositoires fusibles, et elle conditionne tout le phénomène de l'absorption.

ECKERT et MÜHLEMAN (28, 63) ont constaté que la libération d'un principe actif non soluble dans l'excipient gras est lié directement à la température de fusion de cet excipient et que la libération effective de ce type de principe actif ne se fait qu'après fusion complète du suppositoire, c'est-à-dire la liquéfaction ou la "fusion claire". La durée de fusion de la masse est donc un paramètre important : plus celle-ci sera brève, plus le principe actif sera libéré rapidement.

VILLEMEY M.C. (98) a étudié les propriétés thermiques de certains excipients gras, dont celles des suppocires AM et BM. L'auteur a comparé les temps de liquéfaction des excipients seuls et de suppositoires (avec principe actif) et a trouvé les résultats suivants :

SUPPOCIRE	Temps de liquéfaction		Plage de fusion Excipient en °C
	Excipient seul	Suppo- sitoires	
AM	8 mn 20	8 mn 32	35 - 36,5
BM	13 mn 45	14 mn 30	36 - 37,5

Nous avons vu déjà que les suppocires AM et BM ont en commun un indice d'hydroxyle faible, ils ont, d'après le tableau ci-dessus, une même plage de

fusion, mais décalée dans l'échelle des températures, ils présentent, en plus, des temps de liquéfaction différents. Tenant compte de ces données, nous pouvons penser que la masse à base de suplocire AM aura toute chance de mieux atteindre dans le rectum du lapin (39°5) le stade de la "fusion claire" et, par conséquent, de mieux libérer les antigènes contenus dans les suppositoires.

3.1.2. Les facteurs liés à la formulation :

3.1.2.1. Les facteurs liés aux principes actifs :

Dans la forme galénique, le mécanisme de l'absorption commence par une mise en solution (ou en suspension) du principe actif libéré. Notons que certaines substances peuvent s'infiltrer à travers les pores de la muqueuse rectale. Trois facteurs liés aux principes actifs interviennent dans notre cas :

- les caractères de solubilité des principes actifs dans le milieu rectal ;
- l'état particulaire, c'est-à-dire la granulométrie, la mouillabilité et la forme particulaire ;
- et la concentration en principe actif.

Le premier facteur intéresse les deux anatoxines : nous savons que les milieux biologiques, en général, sont aqueux, et une bonne hydrosolubilité semble favoriser à la fois la libération et l'absorption. Donc, étant donné le caractère hydrosoluble des deux anatoxines, elles se dissoudront dans le milieu rectal aqueux avant d'être absorbées par la muqueuse.

D'autres facteurs interviennent aussi, tel que le degré d'ionisation du principe actif dans le milieu

rectal, il dépend, d'une part, du pI des deux anatoxines et, d'autre part, du pH du milieu environnant.

Certains auteurs ont montré que la résorption est maximale lorsque le pH correspond au point iso-électrique de la molécule (P.I. diphtérique = 4,5 - 4,9 P.I. tétanique = 5,0 - 5,2) (51, 52).

L'état particulaire intéresse les antigènes bactériens typhiques et paratyphiques A et B.-- RITESCHEL et coll. (83) ont étudié in vivo l'influence de la grosseur des particules de la proxyphylline sur la vitesse et l'importance de l'absorption rectale et sont arrivés à la conclusion suivante :

"Contrairement aux résultats des expériences in vitro, "le médicament à grosses particules a été absorbé "plus vite et en plus grandes proportions que celui "à petites particules".

Apparemment, si nous appliquons ce raisonnement aux bactéries tuées qui sont de petite taille (μ), sans considérer les agglomérats qu'elles peuvent former, on peut dire qu'elles étaient peu ou pas absorbées ; c'est ce qui explique peut-être l'hétérogénéité de la réponse immune correspondant aux antigènes bactériens, et même l'absence totale de réponse dans le cas du suppocire AS₂X.

La concentration en principe actif de la forme galénique joue un rôle. Certains auteurs (63) admettent que le principe actif est mieux cédé à l'organisme et l'excipient se trouve en grande quantité par rapport à la substance médicamenteuse.

C'est ainsi qu'il a été prouvé que le pourcentage de libération de chlorhydrate de procaïne (principe actif hydrosoluble) diminuerait avec l'augmentation

de concentration de ce produit dans la forme suppositoire et que le pourcentage maximum du taux de libération serait obtenu pour la formule renfermant une faible quantité de procaïne (1 %).

Il semble que notre expérimentation confirme cette notion et que, par conséquent, les antigènes, surtout bactériens, doivent être administrés à des concentrations moins importantes dans la formule de suppositoires si l'on veut obtenir une réponse immune.

Mais ces facteurs liés aux principes actifs ne peuvent être considérés isolément. En effet, ils n'interviennent qu'en fonction d'autres facteurs liés à l'excipient.

3.1.2.2. Les facteurs liés à l'excipient :

C'est en fonction de l'affinité du principe actif pour l'excipient et/ou pour le milieu rectal que le principe actif est absorbé. Ceci nous conduit à la notion d'hydrophilie et de lipophilie des excipients, et en particulier à l'indice d'hydroxyle.

- L'indice d'hydroxyle a souvent été pris comme témoin de l'hydrophilie relative d'un corps gras, et certains auteurs (63, 67) ont tenté de relier l'indice d'hydroxyle d'un excipient donné à la libération d'un principe actif qui lui est incorporé. Deux séries de résultats nous paraissent retenus en ce qui concerne l'influence de l'indice d'hydroxyle sur la libération du principe actif :

D'après l'analyse des résultats du deuxième lot de lapins, l'AS₂X qui possède un indice d'hydroxyle plus élevé que les autres excipients semble conduire aux taux d'anticorps antidiphtériques les

plus faibles ; la relative hydrophilie de l'excipient diminue la biodisponibilité d'un principe actif hydrosoluble.

Le tableau ci-dessous montre que l' AS_2X est le seul à ne pas donner de réponse en anticorps anti-Salmonella typhi et paratyphi A et B ; la relative hydrophilie de l'excipient diminue là aussi la disponibilité biologique d'antigènes particuliers à tendance hydrophile.

Suppocire	Indice d'hydroxyle	Antigènes - Réponse en anticorps anti S. typhi et paratyphi A et B					
		TO	TH	AO	AH	BO	BH
AM	0 - 5	+	+	+	+	+	+
AS_2X	20 - 30	-	-	-	-	-	-
BM	0 - 5	+	+	+	+	+	+

- L'étalement : La capacité d'étalement d'un suppositoire introduit dans le rectum correspond à la surface d'échange qu'offre le suppositoire à la muqueuse.

La surface d'échange conditionne directement l'absorption du principe actif : la libération sera d'autant meilleure que la surface de contact sera importante. VILLEMEY M.C. (98) a cherché à assurer in vitro la capacité d'étalement à 37°C pour certains excipients, parmi lesquels les suppocires AM, AS_2X et BM.

Excipient	Capacité d'étalement (exprimée en mm ²)
AM	340
AS ₂ X	445
BM	210

Si nous appliquons ces résultats aux formules des suppositoires, et sans perdre de vue la notion que l'introduction du principe actif provoque une diminution de la surface d'étalement - VILLEMEY M.C. (98) -, nous pouvons dire que nous arrivons au résultat inverse avec les principes actifs de notre cas : on pourrait penser que cette contradiction pourrait être levée en admettant que les principes actifs solubles se conduisent comme des agents tensio-actifs et augmentent la surface d'étalement.

A côté de ces facteurs liés soit aux principes actifs, soit à l'excipient, l'ensemble (principes actifs + excipient) peut intervenir spécifiquement.

3.1.2.3. L'interaction principe actif/excipient ou principe actif/principe actif :

- L'interaction principe actif/excipient : Des interactions principe actif/excipient sont possibles et peuvent modifier les phénomènes de libération et d'absorption, ceci par formation de complexes ou d'associations dont le résultat est, suivant les cas, une augmentation ou une diminution de l'absorption prévue du principe actif. Dans notre cas, ces possibilités existent : certaines molécules

ou groupements atomiques, aussi bien de l'excipient que des anatoxines ou des particules, sont des dipôles permanents ; ainsi, il pourrait s'établir des liaisons hydrogènes entre les hydroxyles du suppocire AS_2X relativement hydrophile et les groupements amides des chaînes protéiniques (anatoxines) ou polysaccharidiques (antigènes particuliers) qui peuvent fort bien expliquer le comportement du suppocire AS_2X .

- De même qu'il peut y avoir la formation de ce que l'on appelle des "pelotes statistiques" : de nombreuses molécules unidirectionnelles réalisent des chaînes flexibles ; bien que très énergiques, les liaisons covalentes laissent une certaine liberté aux atomes qu'elles lient. Il en résulte que pour une chaîne très longue, le nombre de configurations possibles est quasi infini. On ne peut guère définir qu'une configuration moyenne et on n'envisage les pelotes ainsi formées que sous l'angle statistique : d'où le nom de "pelotes statistiques".

Les polysaccharides forment, en général, ce genre de pelotes statistiques (40).

3.1.3. Essai de comparaison générale des excipients utilisés en fonction de la biodisponibilité des antigènes contenus dans les suppositoires :

Si nous considérons que l'efficacité des excipients peut être évaluée par les réponses immunologiques observées et que nous donnons un ordre de classement des excipients, le rang 1 caractérisant l'excipient le plus favorable au passage d'antigènes par voie rectale, les rangs 2 et 3 étant affectés aux

excipients les moins favorables, et si nous faisons ce classement pour chacun des 8 anticorps dosés, nous obtenons le tableau suivant :

Excipient	AD	ATT	Anticorps anti S. typhi		Anticorps anti S. paratyphi A		Anticorps anti S. paratyphi B	
			TO	TH	AO	AH	BO	BH
AM	2	1	2	1	2	2	2	2
AS ₂ X	3	2	0	0	0	0	0	0
BM	1	3	1	2	1	1	1	1

Donc pour une formule de suppositoire où le principe actif est une association d'antigènes T.A.B.-D.T., il semble que le BM donne de meilleurs résultats que les autres suppocires.

- s'il s'agit d'antigène diphtérique, le BM est le meilleur excipient ;
- par contre, c'est le suppocire AM qu'il faut utiliser lors de la formulation de suppositoire dont le principe actif serait l'antigène antitétanique ;
- pour les anticorps anti-Salmonella typhi et paratyphi A et B, il semble que le suppocire BM est le plus valable ;
- quant au suppocire AS₂X, il est à déconseiller lors de l'élaboration d'une formule contenant ce type d'antigène.

3.2. LES FACTEURS IMMUNOLOGIQUES -

Utilisant des antigènes qu'une étude précédente (64) avait montré aptes à faire apparaître des anticorps sériques dans une immunisation par voie rectale chez le lapin, nous avons étudié les modalités d'absorption de ces substances et les facteurs susceptibles d'intervenir. Il paraît évident que, à côté des facteurs spécifiquement galéniques précédemment envisagés, des facteurs d'ordre immunologique interviennent dans une expérimentation de ce type.

Reprenant des travaux antérieurs (12, 71) qui avaient donné des résultats contradictoires, LEMETAYER et RAMON (57) avaient confirmé qu'une immunisation par voie rectale pouvait être induite par l'anatoxine tétanique chez le lapin, et en analysant les conditions de cette immunisation les auteurs avaient mis en évidence que la réponse immune différait selon l'emplacement du dépôt de l'antigène sur la muqueuse. Comme cette réponse était moins importante lorsque l'antigène était porté à l'aide d'une sonde plus profondément dans le côlon (20 cm) que lorsqu'il était déposé sous forme de suppositoire à 4 ou 5 cm dans le rectum, on a pu penser que les sucs gastriques exerçaient une action destructrice vis-à-vis des antigènes. Le rôle de la flore fécale ne peut être impliqué chez le lapin, puisqu'elle est absente tout le long du côlon (91).

Dans notre expérimentation, l'utilisation de la forme suppositoire a placé les substances actives sur une muqueuse exempte de sucs gastriques et de flore saprophyte, mais par contre, fonctionnellement peu "équipée" du point de vue immunologique. En effet, nous avons vu que la muqueuse rectale ne comporte, chez le lapin, qu'un petit nombre d'éléments lymphoïdes, représentés par les lymphocytes de la lamina propria et des follicules clos isolés peu nombreux, et aucune plaque de Peyer, ce qui implique une réponse immune limitée.

La faible densité des plasmocytes de la lamina propria rectale suggère que la réponse locale sous forme d'immunoglobulines sécrétoires est faible, ce qui pourrait être vérifié par l'étude du taux des immunoglobulines présentes dans le mucus rectal. Il ne semble pas, par contre, que l'étude des anticorps présents dans les matières fécales, étant donné les conditions particulières du transit intestinal chez le lapin, puisse apporter les renseignements que HIRSCH et coll. (48) ont trouvés en étudiant les copro-immunoglobulines humaines.

La réponse générale sous forme d'anticorps sériques, à la suite d'administration locale d'antigène, résulte d'une double sécrétion : sécrétion locale suivie de transfert et sécrétion générale. La synthèse locale d'IgA sérique par les plasmocytes de la muqueuse rectale, comme celle des immunoglobulines sécrétoires et pour la même raison, ne peut être que très limitée. La sécrétion d'anticorps, principalement IgM, IgG, dans les organes périphériques tels que les ganglions mésentériques et la rate, à la suite de la migration vers ceux-ci d'immunocytes intestinaux stimulés au niveau des follicules des plaques de Peyer, n'existe pas ici.

La réaction immune de type général ne peut donc résulter, dans notre expérimentation, que de mécanismes permettant à l'antigène présent dans la lumière rectale de traverser la muqueuse et d'atteindre par la voie sanguine et lymphatique les organes susceptibles de recevoir la stimulation et d'assurer la sécrétion d'anticorps : ces mécanismes sont ceux de l'absorption.

Il semble que dans une immunisation de longue durée par voie rectale, il faille tenir comme favorable l'absence de réponse locale sous forme d'immunoglobulines sécrétoires à la surface de la muqueuse : en effet, les études de WALKER

et coll. (99) suggèrent qu'à la suite de stimulations répétées par des macromolécules, des complexes antigène-anticorps peuvent se former à la surface de la muqueuse et empêcher la liaison de l'antigène avec les cellules épithéliales et, par contre-coup, la pinocytose.

L'étude qualitative des immunoglobulines sériques, c'est-à-dire leur répartition selon les différentes classes, comme elle a été faite par EDDIE et coll. (29) lors d'une immunisation orale du lapin par *S. typhi murium* 0, représenterait sans doute une approche intéressante de l'étude de l'immunisation par voie rectale car elle donnerait une connaissance plus approfondie de la réponse obtenue.

Dans la formule IV de notre expérimentation, le rôle de l'adjuvant Principe Actif Ducton dans le développement de la réponse sérique ne semble pas négligeable : les anticorps antidiphthériques, ainsi que les anticorps anti-*Salmonella typhi* 0, sont plus élevés que ceux obtenus avec les autres formules, et pour l'ensemble des anticorps la réponse est plus durable.

Cette stimulation, d'après ce que nous savons de la densité du système lymphoïde du rectum chez le lapin, ne peut pas intervenir au niveau local. Il semblerait que cette stimulation se situe au niveau des cellules du système réticulo-endothélial ganglionnaire ou splénique, la muqueuse rectale ne donnant lieu qu'à un phénomène d'absorption.

Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette expérimentation chez le lapin montrent que les excipients utilisés ont favorisé la biodisponibilité au niveau rectal de la plupart des antigènes choisis, puisqu'une réponse sous forme d'anticorps sériques est apparue.

Mais il semble que cette biodisponibilité n'a pas entraîné une réponse immune locale, mais que, par contre, elle a assuré le passage des antigènes à travers la muqueuse, leur permettant ainsi d'atteindre des structures lymphoïdes profondes.

C O N C L U S I O N S

L'objet de notre travail fut l'étude de l'influence exercée par les excipients pour suppositoires sur la biodisponibilité des antigènes administrés par voie rectale chez le lapin.

Dans cette expérimentation, l'importance accordée à l'aspect galénique s'avère donc justifiée. En effet, l'analyse de nos résultats montre que dans l'ensemble quelque soit l'excipient utilisé, les antigènes protéiques (anatoxine diphtérique et tétanique) induisent une réponse immunologique plus importante et plus régulièrement durable que les antigènes bactériens particuliers (de *Salmonella typhi* et paratyphi A et B).

- Pour les antigènes protéiques

- Le suppocire BM correspond aux meilleures réponses en anticorps antidiphtériques, ce qui prouve que cet excipient assure une meilleure disponibilité de l'anatoxine diphtérique.
- Le suppocire AM semble assurer une meilleure disponibilité de l'antigène tétanique.
- L'utilisation de suppocire AS₂X conduit à une réponse faible en anticorps antidiphtériques et antitétaniques.

- Pour les antigènes particuliers bactériens

- Le suppocire BM correspond aux meilleures réponses immunes
- Le suppocire AM coïncide avec des taux d'anticorps légèrement moins élevés, tandis qu'avec le suppocire AS₂X nous n'avons pas obtenu de réponse immune chez aucun des lapins traités.
- La présence de l'adjuvant d'immunité PAD semble jouer un rôle favorable dans la présence immune en anticorps :
 - antidiphtériques,
 - anti-*Salmonella* (antigène somatique),
 - anti-*Salmonella* paratyphi A (antigène somatique),
 - Anti-*Salmonella* paratyphi B (antigène somatique et flagellaire).

Pour les autres antigènes, on peut dire que cet adjuvant a amélioré sensiblement la réponse en anticorps correspondants.

Notre expérimentation contribue donc à une meilleure connaissance "immuno-galénique" de la biodisponibilité des antigènes administrés par voie rectale chez l'animal : elle ouvre la voie à d'autres expérimentations avec d'autres antigènes et d'autres excipients et -pourquoi pas - peut-être chez l'homme et non chez des lapins.

MIT

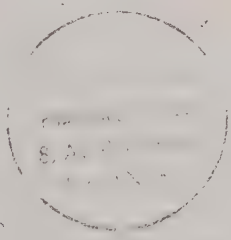
LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

MIT

VU, LE DIRECTEUR DE L'U.E.R. DES
SCIENCES PHARMACEUTIQUES,

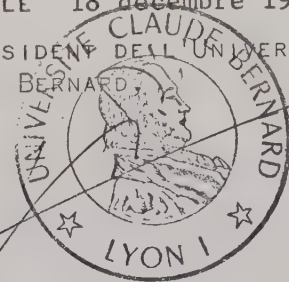
L. ODDOX

L. ODDOX



VU ET PERMIS D'IMPRIMER
LYON, LE 18 décembre 1975

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ
CLAUDE BERNARD



B I B L I O G R A P H I E ---

1. ANDERSSON J., MELCHERS F. et al. - Mitogenic effect of lipopolyssacharide on bone-marrow derived mouse lymphocytes. Lipid A as the mitogenic part of the molecule.
- J. Exp. Med., 1973, 137, № 4, 943-953.
2. ARCHER K., SUTHERLAND R. et GOOD A. - The developmental biology of lymphoid tissue in the rabbit.
- Lab. Invest., 1964, 13, № 3, 259-271.
3. ASHERSON G.L. et ALLWOOD G.G. - Immunological adjuvants.
- In : "The Biological Basis of Medicine", 4, 327-335, Bittar and Bittar, Acad. Press New York, 1969.
4. ASTALDI -
- J. of Retic. Soc., 1969, 6-34.
5. BACQUES C. et DORIER A. - Etude expérimentale de l'absorption des glycérides chez le lapin et le chien par voie recto-colique.
- Ann. Pharm. Fr., 1973, 31, 11, 665-677.
6. BARONE-PAVAUX et BLIN -
- Atlas, anatomie du lapin, dernière éd.
7. BIENENSTOCK J. et STRAUSS H. - Evidence for synthesis of human colostral γ A as 11 S dimer.
- J. of Immunol., 1970, 105, № 1, 274-277.
8. BIZZINI B., PRUDHOMME R.O., TURPIN A. et RAYNAUD M. - Essai de mise en évidence de liaison disulfure dans la toxine tétanique et dans la toxine diphtérique.
- Bull. Soc. Chim. Biol., 1963, 45, 925-932.
9. BLASS J., BIZZINI B. et RAYNAUD M. - Etudes sur le mécanisme de la détoxification des toxines protéiques par le formol.
- Bull. Soc. Chim. Fr., 10, 3957-3965.
10. BRANDTZAEG P. - Structures synthesis and external transfer of mucosal immunoglobulins.
- Ann. Inst. Pasteur, 1973, 194 C, 417-438.

11. CABAU N. et LEVY F.M. - Sur les résultats du titrage de l'antitoxine diphtérique par réaction d'hémagglutination passive.
- Revue d'Immunol., Paris, 1968, 32, 1-2, 31-36.
12. CALMETTE et BRETON M. -
- C.R. Soc. Biol., 1908, T. 64, 163.
13. CALKINS C., CARBONI J. et WAKSMAN B. - B cells in the appendix and other lymphoids organs of the rabbit : C receptor lymphocytes.
- J. of Immunol., 1975, 115, 5, 1339-1345.
14. CALKINS C., OZER H. et WAKSMAN B. -
- Cell Immunol., 1975, 18, 187.
15. CEBRA J.J. - Immunoglobulins and Immunocytes.
- Microbiol. Rev., 1969, 33, N° 2, 159-171.
16. CEBRA J.J., COLBERG J.E. et DRAY S. - Rabbit lymphoid cells differentiated with respect to α , γ , μ , heavy polypeptide chains.
- J. Exp. Med., 1966, 123, 545-557.
17. CEBRA J.J. et ROBBINS J.B. - γ A immunoglobulin from rabbit colostrum.
- J. of Immunol., 1966, 97, 1, 12-29.
18. CID E. - Absorption rectale de médicaments. Influence de la taille des cristaux d'acide acétyl-salicylique.
- Ann. Pharm. Franç., 1974, 32, 5, 273-281.
19. COOPER et al. -
- Fed. Proc., 1967, 26, 252.
20. CORDELIER-DOMBES -
- Immunol. Fondamentale, 1975, I.
21. CORNET A. -
- Thèse Univ., Lyon, Pharmacie, 1968, N° 546.
22. CRAIG W. et CEBRA J. - Peyer's patches : an Enriched source of precursors for IgA producing immunocytes in the rabbit.
- J. Exp. Med., 1971, 134, N° 1, 188-200.
23. CRAIG S.W. et CEBRA J.J. - Rabbit Peyer's patches, appendix and popliteal lymph node B lymphocytes.
- J. of Immunol., 1975, 114, 1, 492-502.

24. CRANDALL R.B. et CEBRA J.J. - The relative proportions of IgG, IgA and IgM containing cells in rabbit tissues during experimental trichinosis.
- Immunol., 1967, 12, 147.
25. DAGUILLARD F. et RICHTER M. - Cells involved in the immune response.
- J. Exp. Med., 1969, 130, 1187-1208.
26. DOUGLAS S.D., KAMIN R.M. et al. - Human lymphocyte response to phyto mitogens in vitro : normal, agammaglobulinemic and paraproteinemic individuals.
- J. of Immunol. 1969, 103, № 6, 1185-1195.
27. DRAPER et SUSSERDOF - Roles of the liver and appendix in the serum hemolysin response in rabbits.
- J. of Immunol., 1965, 95, 306.
28. ECKERT V. et MUHLEMANN H. - Influence of some properties of suppository bases on drug release.
- Pharm. Acta Helv., 1958, 33, 649-661.
29. EDDIE D.S., SCHULKIND M.L. et ROBBINS B. - The isolation and biologic activities of purified secretory IgA and IgG anti-Salmonella typhi murium "0" antibodies from rabbit intestinal fluid and colostrum.
- J. of Immunol., 1971, 106, № 1, 181-190.
30. ELFENBEIN G., HARRISON M. et MAGE R. - Demonstration of proliferation guinea-pig and rabbit bone-marrow derived lymphocytes.
- J. of Immunol., 1973, 110, 5, 1340-1344.
31. FAUVE R. - Les immunostimulants bactériens.
- C. Méd., I.M.M., 1975, 15, № 2, 14-19.
32. FAUVE R. - Stimulation of macrophages by phospholipides.
- Path. Biol., 1975, 23, 6, 450.
33. FINGER H., EMMERLING P. et al. - Increased primary immune response and priming in mice to subimmunogenic doses of sheep erythrocytes by Bordetella pertussis.
- Experientia, 1969, 25, № 8, 866-867.
34. FREUND J. - Some aspects of active immunisation.
- Rev. Microbiol., 1947, 1, 291-308.
35. FREUND J. et al. - Sensitization and antibody formation after infection of tubercle bacilli and paraffin oil.
- Proc. Soc. Exp. Biol., N.Y., 1937, 37, 509-513.

36. FRIENDENSTEIN A. et GONCHARENKO I. - Morphological evidence of immunological relationships in the lymphoid tissue of rabbit appendix.
- Nature, 1965, 12, 1113-1115.
37. GALL D. - Observations on the properties of adjuvants.
- Inter. Symp. on Adj. of Immunity, 1967, 6, 39-48.
38. GELZAYD E.A., KRAFT S.C. et FITCH F.W. - Immunoglobulin A : localization in rectal mucosal epithelial cells.
- Science, 1967, 157, N° 93, 930-931.
39. GOOD R.A., DALMASSO P., MARTINEZ C. et ARCHER K. - The role of the thymus in development of immunologic capacity in rabbits and mice.
- J. Exp. Med., 1962, 116 773-795.
40. GREMY F. et J.C. - Elements de biophysique, II, 268-270.
- Dernière éd.
41. HALL J.G. et SMITH M.E. - Homing of lymphoïne immunoblasts to the gut.
- Nature (Lond.), 1970, 226, 262-263.
42. HALPERN M.S. et KOSHLAND M.E. - Novel subunit in secretory IgA.
- Nature, 1970, 228, 1276-1278.
43. HANAOKA M., NOMOTO K., WAKSMAN B. - Appendix and gamma-M antibody formation.
- J. of Immunol., 1970, 104, 3, 616-625.
44. HARRIS et al. -
- J. of Immunol., 1948, 58-27.
45. HENRY C., FAULK P. et KUHN L. - Peyer's patches : immunologic studies.
- J. of Exp. Med., 1970, 131, 1200-1210.
46. HERZOG F., GAIFFE M., TURPIN A. et BIZZINI B. - Titrage des immunoglobulines antitétaniques chez l'homme.
- La Nouv. Presse Méd., 1972, 1, 14 935-938.
47. HILLEMAN M.R. - Considerations for safety and application of emulsified oil adjuvants to viral vaccines.
- Inter. Symp. on Adj. of Immunity, 1967, 6, 13-26.
48. HIRSCH-MARIE H., BODIN F., MICHTENSTEIN H. et CONTE M. - Etude quantitative des immunoglobulines dans les sécrétions jéjunales et le contenu fécal.
- Sem. Hop. Paris, 1974, 50, N° 14, 957-961.

49. JACOTON H. - Le latex d'*Hevea brasiliensis* en tant qu'adjuvant de divers vaccins.
- C.R. Acad. Sc. Paris, 1947, 224 1390-1392.
50. JOHNSON A.G., GAINES S. et al. - Studies on the O antigen of *Salmonelle typhi*. V - Enhancement of antibody response to protains antigens by the purified lipopolysaccharide.
- J. Exp. Med., 1956, 103, 225-246.
51. KADIS S., MONTIE T.C. et AJL S.J. -
- Microbial Toxins, Volume II B, Academic Press, New York and London, 1971.
52. KADIS S., MONTIE T.C. et AJL S.J. -
- Microbial Toxins, Volume II A, Academic Press, New York and London, 1971.
53. KAGNOFF M. et CAMPBELL S. - Functional characteristics of Peyer's patches lymphoid cells.
- J. of Exp. Med., 1974, 139, 398-406.
54. KONDA S. et HARRIS T.N. - Effect of appendectomy and of thymectomy with X-irradiation in young rabbits.
- J. of Immunol., 1966 97, 6, 805-814.
55. KUNZE F. - Vergleichende untersuchungen über die Abgabe von Arzneistoffen aus Suppositortenfettgrund Massen in vitro und in vivo.
- Dissertation, Hamburg, 1964.
56. LANDY M. et TRAPANI R.J. - Comparison of a hemagglutination procedure and the rabbit interadermal neutralisation test for the assay of diphteria anti-toxin in human sera.
- The Americ. J. of Hyg., 1955, 61, 2, 143-154.
57. LEMETAYER F. - Essais d'immunisation active du lapin et du cobaye par administration d'anatoxine tétanique par les voies buccale et rectale.
- C.R. Soc. Biol., 1935, 2, 53-56.
58. LISON L. - Statistique appliquée à la biologie expérimentale. La planification de l'expérience et l'analyse des résultats.
- Gauthier-Villars, éd., 1958.
59. MERRITT K. et JOHNSON A.G. - The adjuvant action of bacterial endotoxins on antibody formation. Enhancement of antibody formation by nucleic acids.
- J. of Immunol., 1965, 94, N° 3, 416-422.

60. MEUWISSEN H.J. et KAPLAN G.T. - Role of rabbit gut - Associated lymphoid tissue in cell replication, the follicular cortex as primary germinative site.
- Pr. Soc. Exp. Biol., 1969, 130, 300-304.
61. MILLER J.F., SPRENT J., BASTEN A. et al. - Cell to cell intereaction in the immune response.
- J. of Exp. Med., 1971, 143, 1266-1284.
62. MOUSTARDIER G. -
- Bactériologie Médicale, 4ème éd., 1972.
63. MUHLEMANN H. et GRAFFENRIED D. - Untersuchung über die Abfode von Arzneistoffen aus Suppositorien in Abhangigkeit der Arzneistoffkonzentration.
- Pharm. Acta. Helv., 1961, 36, 186-193.
64. NABI N. -
- Thèse Univ. Pharm. Lyon, 1975, N° 624.
65. NAKASHINA I., OHTA F. et al. - Adjuvant action of capsular polysaccharide of Klebsiella pneumoniae on antibody response. Factors affecting its action.
- Jap. J. Microbiol., 1973, 17, N° 1, 35-43.
66. NEUWALD F. - Aspects biopharmaceutiques des préparations médicamenteuses par voie rectale.
- Présenté au Séminaire de Pharmacie industrielle, le 9.12.1971, Université de Münster.
67. NEUWALD F. et KUNZE F. - Vergleichende untersuchunge über die Abgade von Salicylaten aus Suppositorienfettgrundmassen in vivo und vitro.
- Arzneimittelforsch, 1964, 14, 9, 1029-1037.
68. OUDIN J. - L'allotypie de certains antigènes protéiques du sérum.
- C.R. Ac. Sc. Paris, 1956, 242, 1-3.
69. OZER H. et WAKSMAN B.H. - Appendix and gamma-M antibody formation.
- J. of Immunol., 1970, 105, 3, 791-792.
70. PARAF A. - Les adjuvants de l'immunité.
- In : Collection Médicale à révision périodique - Immunol., 601-653, Flammarion, 1972.
71. PANISSET -
- C.R. Soc. Biol., 1911, 70, 681.

72. PEREY D.V., COOPER M.D. et GOOD R.A. - Lympho-epithelial tissues of the intestine and differentiation of antibody production.
- Science, 1968, 8, 161, 265-266.
73. PERSON D.A. et MARKOWITZ M. - Immunochemical studies of the phytohemagglutinin, Concanavalin A.
- J. of Immunol., 1969, 103, N° 2, 225-232.
74. POMPIDOU A. -
- Conférence C.E.S. Sup. Immunol., U.E.R. de Pharmacie de Lyon, 1972.
75. RAFF M.C. et OWEN - Thymus-derived lymphocytes : their distribution and role in the development of peripheral lymphoid tissues of the mouse.
- Eur. J. Immunol., 1, 27.
76. RAMON G., RICHOU R. et al. - Sur les substances adjuvantes de l'immunité. Nouvelles recherches.
- Rev. Immunol. Paris, 1950, 14, 205-214.
77. RAMON G. et STAUB A. - Immunologie. Sur la vaccination charbonneuse.
- C.R. Acad. Sci. Paris, 1935, 201, 241-243.
78. RAMON G. et ZOELLER C. - Les vaccins associés par union d'une anatoxine et d'un vaccin microbien (T.A.B.) ou par mélange d'anatoxines.
- C.R. Soc. Biol. Paris, 1926, 94, 106-108.
79. RAYMOND M., BIZZINI B. et RELYVELD E.H. - Composition en amino-acides de la toxine diphtérique purifiée.
- Bull. Soc. Chim. Biol., 1965, 47, 2, 261-266.
80. RAYNAUD M. et al. - Etude de l'effet immunostimulant de diverses espèces de corynébactéries anaérobies et de leurs fractions.
- Ann. Inst. Pasteur, 1972, 122, 695-700.
81. RELYVELD E.H. et RAYNAUD M. - Etude sur le phosphate de calcium comme adjuvant de l'immunité.
- Inter. Symp. on Adj. of Immunity, 1967, 6, 77-88.
82. RITSCHER W.A. - Absorption de médicaments.
- Pharma. International 1974, 1, 2, 48-51.
83. RITSCHER W.A. et ROTMENSCH J. - Etude de la disponibilité biologique de la proxiphylline sur deux différentes bases de suppositoires.
- Pharma. International, 1974, 4, 13-15.

84. ROTHBERG et KRAFT -
- J. of Allergy Clin. Immunol., 1973.
85. SCHERR G.H., MARKOWITZ A.S. et al. - A new alginate adjuvant.
- J. of Applied Bacteriol., 1965, 28, N° 1, 174-180.
86. SCHWARTZ D. - Méthodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes.
- Flammarion, dernière éd.
87. SHAW G.M., ALVORD E. et al. - Substitutes of mycobacteria in Freund's adjuvants in the production of experimental "allergic" encephalomyelitis in the guinea-pig.
- J. of Immunol., 1964, 92, 28-40.
88. STRAUCHEN J.A., MOLDOW C.H. et al. - Secretion of a phyte-hemagglutinin binding glycoprotein in man.
- J. of Immunol., 1970, 104, 3, 766-768.
89. SUSSDORF D.H. - Repopulation of the spleen of X-irradiated rabbits by tritium. Labeled lymphoid cells of the shulde appendix.
- J. Infect. Dis., 1960, 107, 108-114.
90. SUTHERLAND D., ARCHER K. et GOOD R. - Role of the appendix in development of immunologic capacity.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 115, 673-676.
91. TAGAND R. et BARONE R. -
- Abrégé de splanchnologie comparée, 1948.
92. TAM NGUYEN DANG et al. - Propriétés immunologiques des parois cellulaires bactériennes. Etude comparée du *Corynebacterium parvum* et du *Bacillus magaterium*.
- C.R. Acad. Sc. Paris, 1973, 276, série II, 3233-3235.
93. THORDEBECK J.G. - Gamma-globuline and antibody formation in vitro.
- J. Exp. Med., 1960, 112, 279.
94. TODD C.W. - L'allotypie des immunoglobulines du lapin.
- Ann. Immunol. (Inst. Pasteur); 1974, 125, 6, 15-26.
95. VAERMAN J.P., HEREMANS J.F. et VAN KERCKHOVEN G. - Identification of IgA in several mammalian species.
- J. of Immunol., 1969, 103, 6, 1421-1423.

96. VALETTE L., JOUBERT L. et al. - Propriétés immunostimulantes d'un mélange d'hydrocarbures paraffiniques et de glycérides oléiques polyoxyéthylènes.
- Int. Symp. on Adj. of Immunity, 1967, 6, 65-76.
97. VALLEE M., RINJARD P. - Etude sur l'entérite hypertrophiante des bovidés.
- Rev. Gén. Méd. Vét., 1926, 35, 1-9;
98. VILLEMEY M.C. -
- Thèse Univ. Pharm. Lyon, 1975, N° 621.
99. WALKER W.A., WU M., ISS EL BACHER K. et BLOCH K. -
Intestinal uptake of macromolecules.
- J. of Immunol., 1975, 115, 3, 854-861.
100. WAROLAWA C. et APRILE M.A. - Fields trials of aluminium adjuvant vaccines and toxoids : a review.
- Inter. Symp. on Adj. of Immunity, 1967, 6, 257-266.
101. WHITE R.G., COONS A.H. et al. - Studies on antibodies production. IV - The role of wax fraction of Mycobacterium tuberculosis in adjuvant emulsions on the production of antibody to egg albumin.
- J. Exp. Med., 1955 102, 83-104.
102. WINER B.J. - Statistical principles in experimental design.
- M.C. Graw-Hill Book Company inc., 1962, New York, London.
103. WOODHOUR A.F., HILLEMANN M.R. et al. - New metabolizable immunologic adjuvant for human use. Development of highly purified influenza virus vaccine in "adjuvant 65".
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1966 123, 778-782.
104. ZEMSKOV V.M. - Enhancement of antiinfectious body resistance with acid preparations.
- Byull. Eksp. Biol. Med., 1972, 73, N° 4, 71-74.
-

S O M M A I R E

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION.....	1
PLAN.....	3
 PREMIERE PARTIE : RAPPEL SUR LE SYSTEME LYMPHOIDE DU LAPIN.....	 7
1. Schéma général du système digestif.....	9
2. Description du système lymphoïde du lapin	10
3. Rôle du système lymphoïde intestinal dans le développement de l'immunité.....	15
 DEUXIEME PARTIE : LES COMPOSANTS DE LA FORME GALENIQUE.....	 23
1. Les antigènes utilisés.....	24
2. Les excipients utilisés.....	35
 TROISIEME PARTIE : LES MODALITES EXPERIMENTALES..	46
1. La fabrication des suppositoires.....	47
2. Le protocole expérimental de l'immuni- sation.....	52
3. Les méthodes de contrôle de l'immunisation	54
 QUATRIEME PARTIE : LES RESULTATS EXPERIMENTAUX...	64
1. Tableaux des taux d'anticorps.....	65
2. Les courbes d'immunisation.	65
 CINQUIEME PARTIE : ANALYSE ET DISCUSSION DES RESULTATS.....	 155
1. Analyse des résultats.....	156
2. Interprétation statistique des résultats.	161
3. Discussion.....	171
 CONCLUSION.....	187

R E S U M E

L'objet de notre travail a été l'étude de l'influence de certains excipients pour suppositoires sur la biodisponibilité des antigènes administrés par voie rectale chez le lapin.

Comme principe actif, nous avons utilisé le vaccin commercial injectable "antidiphthérique-antitétanique-anti-Salmonella typhi et paratyphi A et B", connu sous le nom de D.T.-TAB. et fabriqué par l'Institut Pasteur de Paris.

Après lyophilisation, ce vaccin a été incorporé à trois types d'excipients pour suppositoires : glycérides semi-synthétiques différant par certaines de leurs propriétés physico-chimiques (zone de fusion et indice d'hydroxyle notamment) et commercialisés sous les appellations suivantes : Suppocire AM, Suppocire AS₂X, Suppocire BM, correspondant à trois formules différentes.

Nous avons préparé une quatrième formule de suppositoire à partir du Suppocire BM dans lequel nous avons incorporé, en plus du vaccin D.T.-TAB. lyophilisé, un adjuvant d'immunité : "Ducton", principe actif de structure nucléo-lipo-polysaccharide et connu sous le nom de P.A.D. (Laboratoires Sarbach).

L'expérimentation immunologique réalisée a porté sur quatre lots de 10 lapins chacun. Les lapins de chaque lot ont été traités par une formule différente de suppositoires, selon un protocole expérimental déterminé (fréquence et durée de l'administration des antigènes, mode d'application des suppositoires).

L'absorption des antigènes au niveau de la muqueuse rectale du lapin a induit une réponse immuno-
logique se traduisant par l'apparition d'anticorps sériques :
les anticorps antidiphtériques et antitétaniques ont été
dosés par des méthodes d'agglutination passive ; les agglu-
tinines O et H antityphiques et paratyphiques A et B ont
été évaluées par la technique de sérodiagnostic de Widal-
Félix.

EFFECT OF EXCIPIENTS ON ANTIGEN D.T.-TAB BIOAVAILABILITY
IN RABBIT RECTAL ABSORPTION

SUMMARY.-

We studied effects of some suppository excipients on bioavailability of antigens rectally inoculated in the rabbit.

Active constituent was the injectable, regular vaccine against diphtheria, tetanus, typhoid and paratyphoid A and B, known as D.T.-TAB and prepared by the Institut Pasteur, Paris.

We obtained three suppository recipes by incorporation of lyophilised vaccine to three kinds of suppository excipients : semi-synthetic glycerides differing on some physical, on chemical properties (melting point, hydroxyl indice ...) and registered as : Suppocire AM, Suppocire AS₂X, Suppocire BM.

A fourth suppository recipe was made up with suppocire BM, vaccine D.T.-TAB and an immunoadjuvant : "Ducton", nucleo-lipo-polysaccharid active constituent, named P.A.D. and prepared by Sarbach Laboratories.

Each recipe was administered to a group of ten rabbits, according a definite procedure.

Antigen absorption by rabbit rectal mucosa induced an immunologic response with production serum antibodies. Antidiphtheria and anti-tetanus antibodies were tested by passive agglutination. Agglutination to the O and H antigens of *S. typhi* and paratyphi A and B were challenged by Widal-Felix serodiagnostic.
